

BIOCHEMISCHE
UND MORPHOLOGISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG
DER ZELLPROLIFERATION BEI DER
NIERENTUMORINDUKTION DURCH
DIMETHYLNITROSAMIN

Wolfgang Segiet

Diss.
München



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0057

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. M. Eder

BIOCHEMISCHE UND MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG
DER ZELLPROLIFERATION BEI DER NIERENTUMORINDUKTION DURCH
DIMETHYLNITROSAMIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Segiet
aus
München
1984

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter:	Professor Dr. H. Rabes
Mitberichterstatter:	Professor Dr. M. Eder
Dekan:	Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:	26.3.1985
-----------------------------	-----------

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Rabes für die Themenstellung, die Einführung in die wissenschaftliche Arbeitsweise und die freundliche Anleitung und Betreuung bei dieser Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Bassermann und Herrn Priv.-Doz. Permanetter danke ich für die Unterstützung bei der histologischen Diagnostik.

Frau Rode danke ich für die technische Assistenz bei den biochemischen Untersuchungen und die Herstellung der graphischen Darstellungen, Frau Sickert und Frl. Metzger für die Anfertigung der histologischen Präparate.

Herrn Hampe und Frau Döhle danke ich für die phototechnische Bearbeitung.

Die Untersuchung wurde mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Dr. Mildred Scheel-Stiftung durchgeführt.

Abkürzungen

DMN	Dimethylnitrosamin
DEN	Diäthylnitrosamin
MNU	N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff
HU	Hydroxyharnstoff
7 meGua	7-Methyl-Guanin
O ⁶ meGua	O ⁶ -Methyl-Guanin
3 meAd	3-Methyl-Adenin
EDB	Enzymdefektbezirk
KG	Körpergewicht
AG	Ausgangsgewicht

INHALTSVERZEICHNIS

=====

I. BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG DER DNA-ALKYLIERUNG AN DER RUHENDEN UND PROLIFERIERENDEN RATTE NIE FÜR DIE TUMORINDUKTION DURCH DIMETHYLNITROSAMIN (DMN)	Seite
I. ALLGEMEINER TEIL	1
1.1 Nitrosamine als chemische Carcinogene	1
1.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehung und chemische Eigenschaften	1
1.1.2 Toxische und cancerogene Wirkung von DMN	3
1.1.3 Metabolismus von DMN	6
1.1.4 Cancerisierung der Nitrosamine im Rattenorganismus	6
1.1.5 Bedeutung der Basenalkylierung	7
1.1.6 Reparaturmechanismen für alkylierte DNA-Basen	10
1.2 Die Bedeutung der Zellproliferation bei der Carcinogenese	11
1.3 Die Proliferationskinetik der verbleibenden Niere nach unilateraler Nephrektomie	15
1.4 Fragestellung und Skizzierung des Versuchsmodells	18
2. MATERIAL UND METHODE	21
2.1 Versuchstiere	21
2.2 Operatives Vorgehen	21
2.3 Durchführung des Versuchs	21

2.4	Tötung der Tiere und Nierenentnahme	23
2.5	DNA-Isolierung	24
2.6	Isolierung der Basen aus der DNA und Radioaktivitätsnachweis	25
2.7	Zusatzversuch: Autoradiographische Untersuchung zur Zellproliferation der verbleibenden Niere zum Zeitpunkt der DNA-Isolierung	26
2.7.1	Versuchstiere	26
2.7.2	^3H -Thymidin-Pulsmarkierung	27
2.7.3	Herstellung der histologischen Präparate und der Autoradiographien	27
2.7.4	Auswertung der Autoradiographien	28
3.	ERGEBNISSE	29
3.1	Berechnung der molaren Mengen an Adenin und Guanin sowie der Gesamtaktivität der DNA-Hydrolysate	29
3.2	Radiochromatographische Trennung der DNA-Basen	31
3.3	Berechnung der molaren Mengen der Alkylierungsprodukte	33
3.4	Beziehung zwischen der Dosis der applizierten DMN und der molaren Fraktion alkylierter Basen	42
3.5	Zusatzversuch: Der ^3H -Thymidin-Markierungsindex zum Zeitpunkt der DNA-Isolierung	46
4.	DISKUSSION	50

II.	MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG DER ZELLPROLIFERATION FÜR DIE TUMORINDUKTION AN DER RUHENDEN UND PROLIFERIERENDEN RATTEN- NIERE DURCH DIMETHYLNITROSAMIN (DMN)	
1.	EINLEITUNG	59
1.1	Einteilung der DMN-induzierten Nierentumoren	59
1.2	Fragestellung und Skizzierung des Versuchsmodells	61
2.	MATERIAL UND METHODE	62
2.1	Versuchstiere	62
2.2	Operatives Vorgehen und DMN-Applikation	62
2.3	Einteilung der Versuchstiere	62
2.4	Gewichtskontrolle	63
2.5	Tötungsintervalle, Sektion der Versuchstiere und histologische Aufarbeitung entnommener Organe	64
2.6	Einteilung der Nierentumoren, Größen- bestimmung und autoradiographische Auswertung	65
2.7	Zusatzversuch: Das Proliferationsverhalten der regenerierenden Rattenniere nach Hydroxyharnstoff-Applikation	66
2.7.1	Versuchstiere	67
2.7.2	Hydroxyharnstoff-Dosis und Applikation	67
2.7.3	Auswertung der Autoradiographien	68
3.	ERGEBNISSE	69
3.1	Gewichtsverlauf unilateral nephrektomierter Ratten nach DMN bei verschiedenen Dosen und Injektionszeitpunkten	69

3.2	Überlebenszeiten	70
3.3	Todesursachen	78
3.4	Nierentumorinzidenz in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt von DMN	78
3.5	Beziehung zwischen Tumorgröße und Differenzierungsgrad	81
3.6	Beziehung zwischen Differenzierungsgrad und Markierungsindex der Tumoren	91
3.7	Organverteilung der DMN-induzierten Tumoren und Spontantumoren	93
3.8	Zusatzversuch: Der ^3H -Thymin-Markierungsindex in der regenerierenden Rattenniere nach 24ständiger HU-Blockade	95
4.	DISKUSSION	99
	ZUSAMMENFASSUNG	112
	LITERATURVERZEICHNIS	115
	LEBENS LAUF	127

=====

=====

I. BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG DER DNA-ALKYLIERUNG AN DER RUHENDEN UND PROLIFERIERENDEN RATTENNIERE FÜR DIE TUMORINDUKTION DURCH DIMETHYLNITROSAMIN (DMN)

1. ALLGEMEINER TEIL

=====

1.1 Nitrosamine als chemische Carcinogene

1.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehung und chemische Eigenschaften

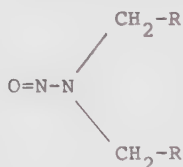
Seit der Entdeckung von Magee und Barnes (1956), daß DMN bei Ratten Lebertumoren erzeugt, wurden Nitrosamine in einer Vielzahl von Untersuchungen auf ihre carcinogene Wirkung untersucht (Druckrey et al. 1967, Magee u. Barnes 1967, Magee et al. 1975). Druckrey et al. (1967) fanden bei 65 N-Nitroso-Verbindungen eine auffällige Organotropie, die in erster Linie von der chemischen Konstitution bestimmt ist, aber auch von der Dosierung und Applikationsart abhängt.

DMN führt beispielsweise nach einmaliger oraler Gabe von 30 mg/kg bei 3 von 15 Ratten zu anaplastischen Tumoren an der Niere (Magee u. Barnes 1962), wogegen eine einmalige Inhalation von 37 mg/kg bei einem von drei Versuchstieren ein Ethmoidcarcinom hervorruft (Druckrey 1964).

Die Dosis-Wirkungsbeziehung der Nitrosamine ist dadurch gekennzeichnet, daß die Höhe der zur Tumorentstehung notwendigen Gesamtdosis mit der Anzahl der C-Atome stetig zunimmt, von etwa 0,5 g/kg bei Dimethylnitrosamin bis 28 g/kg bei Diamyl-Nitrosamin (Druckrey et al. 1961). In quantitativen Versuchen ergab sich bei einer Vielzahl von Nitrosaminen (Druckrey et al. 1967)

zwischen der Tagesdosis (d) und der Zeit bis zum Auftreten der Tumoren die Beziehung $d \times t^n = \text{konstant}$. Die Werte für n lagen zwischen 2 und 3, das heißt, daß die Wirkung bei dauernder Gabe konstanter Dosen etwa mit dem Quadrat der Expositionszeit anwächst. Somit läßt sich für die cancerogene Wirkung der Nitrosamine eine Summierung irreversibler Primäraffekte annehmen, die durch die jeweilige Einzeldosis verursacht wird. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die zur Krebserzeugung notwendige Gesamtdosis bei Verringerung der Einzeldosen über eine längere Induktionszeit nicht größer wird, sondern signifikant kleiner (Druckrey et al. 1962).

Ihrer chemischen Konstitution nach sind Dialkylnitrosamine Nitroso-Derivate sekundärer Amine und besitzen die chemische Formel:



$\text{R} = \text{H} = \text{Dimethylnitrosamin}$

$\text{R} = \text{CH}_3 = \text{Diethylnitrosamin}$

Die zu ihrer Synthese notwendigen Vorläufer sind Nitrite und sekundäre Amine. Als Dialkylamide der Salpetrigen Säure sind sie gegen konzentriertes Alkali völlig stabil (Druckrey et al. 1967); in saurer Lösung verlieren Dialkylnitrosamine die Nitroso-Gruppe und werden zu sekundären Aminen hydrolysiert. Darüber hinaus sind Nitroso-Verbindungen typischerweise photosensibel, da die Nitrogruppe durch UV-Licht gespalten wird (Magee u. Barnes 1967, Magee et al. 1975).

1.1.2 Toxische und cancerogene Wirkung von DMN

Nitrosamine üben eine primär toxische Wirkung auf die Leber aus. In hohen Dosen induzieren langkettige und zyklische Verbindungen Leberparenchymschäden (Magee et al. 1975), die stärkste Toxizität besitzt jedoch DMN: Unabhängig davon, ob DMN oral, intravenös, intraperitoneal oder subcutan verabreicht wird, erzeugt DMN bei Ratten in einer Dosis um 25 mg/kg akute zentrilobuläre Nekrosen in der Leber, die von Hämorrhagien in der Leber und Lunge begleitet werden. Häufig werden auch hämorrhagischer Aszites sowie Blut im Lumen des Darmes beobachtet. Der Tod tritt in der Regel innerhalb von zwei bis vier Tagen nach Applikation ein, oder es kommt zur völligen Erholung des Tieres (Magee u. Barnes 1967, Druckrey et al. 1967). Bei akut durch DMN vergifteten Ratten konnte an der Niere bei konventioneller histologischer Technik kein zellulärer Schaden nachgewiesen werden (Magee u. Barnes 1967).

Ebenso wie durch DEN (Rabes et al. 1971, Mohr u. Hilfrich 1972, Meister u. Rabes 1973, Fridmann-Manduzio et al. 1977), lassen sich durch DMN nach einmaliger Applikation selektiv Nierentumoren erzeugen. Wird DMN in einer niedrigen Dosis über einen längeren Zeitraum verfüttert, entstehen überwiegend hepatocelluläre Carcinome (Magee u. Barnes 1956, Druckrey et al. 1967), wogegen eine kurze und intensive Fütterung eine hohe Inzidenz von Nierentumoren erzeugt (Magee u. Barnes 1962). Somit entfaltet DMN je nach Dosis und Art der Applikation verschiedene Inzidenzen und Organmanifestationen von Tumoren:

Nach einmaliger intraperitonealer Applikation von 30 mg/kg DMN beobachteten Magee und Barnes (1962) in 20 - 30 % der überlebenden Ratten Nierentumoren. Bei der gleichen Dosis erzielten Montesano et al. (1974) eine Tumorzinzenz an der Niere von 30 % bei männlichen im Vergleich zu 63 % bei weiblichen Tieren. Dar-

über hinaus beobachteten die genannten Autoren auch Tumoren der Nasenhöhle, Brustdrüse und Lunge.

Für eine einmalige Dosis von 18 mg/kg zeigten Murphy et al. (1966), daß die Tumorzinzidenz an der Niere je nach Applikationsart unterschiedlich ist: Nierentumoren fanden sich nach einem Beobachtungszeitraum von 17 Monaten zu 19 % nach intramuskulärer, 10,6 % nach intraperitonealer, 24,4 % nach retroperitonealer, 23,5 % nach intrarenaler Injektion.

Bei einer Dosis von 9 mg/kg DMN, 28 Std. nach partieller Hepatektomie appliziert, fanden Friedmann-Manduzio et al. (1977) unter anderem eine Tumorzinzidenz von 13 % in der Leber, 13 % in der Niere, 4 % in der Lunge, 4 % an der Operationswunde und 9 % am hämatopoetischen System.

Die LD₅₀ von DMN, die Dosis, bei der die Hälfte der Tiere stirbt, beträgt bei oraler Gabe 30 mg/kg (Magee u. Barnes 1962). Die letalen Leberparenchymschäden in Form von hämorrhagischen zentrilobulären Nekrosen (Magee et al. 1975) können durch eine proteinfreie Diät deutlich gesenkt werden. McLean und Magee (1970) beobachteten einen Anstieg der LD₅₀ von etwa 46 mg/kg bei herkömmlicher Diät auf 79 mg/kg bei proteinfreier Diät. Der Schutz der Leber vor der akut toxischen Wirkung von DMN scheint in einem erniedrigten Metabolismus des Carcinogens zu liegen, da möglicherweise die Aktivität der Enzyme, die DMN in die carcinogene Wirkform überführen, herabgesetzt wird.

Demgegenüber steigt bei proteinfreier Diät die carcinogene Wirkung von DMN an der Niere stark an:

Nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion von 60 mg/kg beträgt die Nierentumorzinzidenz der überlebenden Tiere 100 % (Hard u. Butler 1970/a, McLean u. Magee 1970, Swann u. McLean 1971). Man nimmt an, daß die erhöhte Inzidenz von Nierentumoren

durch einen verminderten Abbau von DMN in der Leber bedingt sein könnte, der zu einem verstärkten Metabolismus in der Niere führt (Swann u. McLean 1968). Es wirkt paradox, daß trotz dieser hohen Tumorrates nach DMN keine akuten strukturellen Schäden in der Niere beobachtet wurden (Magee und Barnes 1967).

Hard (1975) sowie Hard u. Shaw (1974), die aus diesem Grund eingehender die akut toxischen Schäden an der Niere nach DMN untersuchten, fanden in autoradiographischen Analysen, daß der ^3H -Thymidin-Markierungsindex und der Mitoseindex in allen Segmenten des Nephrons sowie in den mesenchymalen Zellen für die Dauer von einem bis drei Tagen nach Carcinogen-Applikation auf nahezu Null abfällt. Auf die Phase der Inhibition der DNA-Synthese folgt eine erhöhte DNA-Synthese sowohl in den epithelialen als auch in mesenchymalen Subpopulationen. Bei den epithelialen Zellen, von denen ausschließlich das proximale und distale Tubulusepithel betroffen ist, beginnt die Proliferation am fünften Tag nach DMN-Applikation und erreicht ihr Maximum am zehnten Tag.

Bei den interstitiellen Zellen, von denen die corticalen Fibrozyten als Target-Zellpopulation für mesenchymale Tumoren angesehen werden, findet man ein Maximum an proliferativer Aktivität am dritten Tag.

Somit scheint eine Korrelation zwischen der Fähigkeit eines Carcinogens zu liegen, einerseits einen akuten toxischen Schaden in bestimmten Zellpopulationen zu verursachen, andererseits eine Proliferationswelle in denjenigen Zellen auszulösen, die als Ursprungszellen von epithelialen und mesenchymalen Tumoren der Niere gelten (Hard 1975).

Auf proliferative Herde in der praeneoplastischen Latenzperiode sowie eine genauere morphologische Charakterisierung der durch DMN induzierten Tumoren soll im zweiten Teil der Arbeit eingegangen werden.

1.1.3 Metabolismus von DMN

Magee (1956) sowie Heath und Dutton (1958) stellten bei ihren Untersuchungen über den Metabolismus von DMN im Rattenorganismus fest, daß das Carcinogen rasch und gleichmäßig im Körper verteilt wird. Nach subcutaner Gabe von ^{14}C -DMN werden 40 % innerhalb der ersten 8 Std. als $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet. Ein relativ kleiner Teil erscheint unverändert in Urin, Kot und Ausatemungsluft (Heath 1962). Bei Ratten, die proteinfrei ernährt werden, ist DMN nach 19 Std. nicht mehr nachweisbar (Swann u. McLean 1971). Die Metabolisierungsrate von DMN ist in verschiedenen Organen der Ratte unterschiedlich: Die Leber metabolisiert das Carcinogen schneller als die Niere, in Muskel und Lunge finden sich nur geringe Aktivitäten. 8 Std. nach Applikation von radioaktiv markiertem DMN ist die Radioaktivität in Leber, Niere und Lunge am höchsten (Knecht 1967).

1.1.4 Cancerisierung der Nitrosamine im Rattenorganismus

Die Beobachtung, daß Nitrosamine nach subcutaner Injektion an der Injektionsstelle keine cancerogene Wirkung entfalten, legt den Schluß nahe, daß nicht die Verbindung selbst, sondern Abbau-
produkte im Rahmen des Metabolismus für die carcinogene Wirkung verantwortlich sind (Craddock u. Magee 1963, Magee et al. 1975). Da Nitrosamine über eine hohe Organspezifität verfügen (Druckrey et al. 1967), könnte die Organverteilung der Tumoren mit einem unterschiedlichen Enzymmuster in den verschiedenen Organen in Zusammenhang stehen (Pegg 1977/a).

Die enzymatische Aktivierung der Nitrosamine in ihre carcinogene Wirkform ist noch nicht vollständig geklärt. Knecht (1966) sowie Magee und Barnes (1967) sehen die zum Metabolismus der Nitrosamine notwendigen Enzyme in N-Dealkylasen aus der Gruppe der mischfunktionellen Oxidasen der Mikrosomenfraktion. Diese Enzyme

kommen in steigender Aktivität in Muskel, Lunge und Niere vor und erreichen ihre höchste Konzentration in der Leber. Nach Magee (1974) und Druckrey et al. (1962) sind die in der Leber vorkommenden alpha-Hydroxylasen für den Metabolismus zum ultimativen Carcinogen verantwortlich.

Die Aktivierung verläuft nach Druckrey et al. (1967) in mehreren Stufen: Den ersten Schritt bildet eine enzymatische alpha-C-Hydroxilierung. Das alpha-Hydroxyalkylnitrosamin wird unter Abspaltung von Aldehyd zum Monoalkylnitrosamin dealkyliert. Da dieses instabil ist, zerfällt es unter Abspaltung von Wasser in Diazoalkan. In wässrigem Medium bei Anwesenheit von H^+ -Ionen entsteht dann über das Alkyl-diazonium-Ion das direkt alkylierend wirkende Carbonium-Ion. Nach Untersuchungen von Lijinsky et al. (1968) mit CD_3 -markiertem DMN scheint dagegen das Diazoalkan keine Zwischenstufe darzustellen, sondern die Methylgruppe wird intakt übertragen. Nur für den ersten Schritt dieser Reaktion sind Enzyme in Form von alpha-C-Hydroxylasen notwendig. Die restlichen Reaktionen laufen spontan ab. Hydroxylasen kommen nicht nur in der Leber vor, sondern auch in verschiedenen anderen Organen. Darin ist eine mögliche Erklärung für die Carcinogenese auch in anderen Organen als der Leber zu sehen (Druckrey et al. 1967).

1.1.5 Bedeutung der Basenalkylierung

Die Metabolisierung von DMN in ein hoch reaktives methylierendes Agens scheint für die carcinogene Potenz von entscheidender Bedeutung zu sein (Magee u. Barnes 1967, Lawley 1974, Magee et al. 1975). Obwohl davon auszugehen ist, daß das elektrophile Carbonium-Ion mit einer Vielzahl von zellulären Makromolekülen wie beispielsweise Proteinen (Craddock 1965) und RNA (Singer 1975)) reagiert, ist allgemein als Arbeitshypothese akzeptiert, daß die Alkylierung der DNA die Grundlage für die Initiation der malignen Transformation darstellt.

Aufgrund des Protonenüberschusses des Carbonium-Ions sind an einer Vielzahl von nukleophilen Zentren der Nucleinsäurebasen Alkylierungen denkbar. Das Hauptalkylierungsprodukt von DMN oder Methylnitrosoharnstoff (MNU) in der Rattenleber ist 7-Methyl-Guanin (Singer 1975, Magee et al. 1975, Pegg 1977/b, Rabes et al. 1979/a). In deutlich geringerer Menge findet sich O⁶-Alkyl-Guanin, 3-Alkyl-Adenin, 1-Alkyl-Adenin, 3-Alkyl-Guanin (Craddock 1973) sowie O²- und O⁴-Alkyl-Thymin und O²-Alkylcytosin (Singer et al. 1981). Ferner wurde die Alkylierung von Phosphaten beschrieben (Singer 1975, O'Connor et al. 1975).

Da eine somatische Mutation auf molekularer Ebene auf einem Austausch von Basen beruhen kann, die den genetischen Code und somit die genetische Information verändert, kommt denjenigen Positionen in der DNA entscheidende Bedeutung zu, die an Wasserstoffbrückenbindungen teilnehmen (Craddock 1973).

Loveless (1969) wies erstmals auf die Bedeutung von O⁶-Alkyl-Guanin für mögliche promutagene Basenalterationen hin. Bei in vitro Versuchen konnte gezeigt werden, daß O⁶-Methyl-Guanin die Incorporation von nicht-komplementären Basen während der Polyribo- oder Polydesoxyribonucleotidsynthese verursacht (Gerchmann u. Ludlum 1973, Abbott u. Saffhill 1977). Eine GC-AT Transitionsmutation (Lawley u. Martin 1975) könnte beispielsweise zu einem bleibenden Schaden in der genetischen Information führen.

Für verschiedene Organe konnte gezeigt werden, daß die Menge und die Persistenz an O⁶-Alkyl-Guanin eng mit der Fähigkeit verschiedener Nitrosamine korreliert, Tumoren zu induzieren (Craddock 1973, Goth u. Rajewsky 1974, Nicoll et al. 1975, Kleihues und Margison 1976, Pegg 1977/a). Diese Korrelation zwischen Alkylierungsprodukt und Mutagenität besteht für das in wesentlich größerer Menge gebildete 7-Alkyl-Guanin nicht (Swann u. Magee 1968, Craddock 1973, Pegg 1977/a).

Das quantitative Ausmaß an Alkylierung des O^6 -Guanin ist jedoch nicht der alleinige verantwortliche Parameter der malignen Transformation von Zellen. Es scheinen vielmehr nach einmaliger Applikation eines Carcinogens bevorzugt Tumoren in Organen zu entstehen, die eine deutlich geringere Fähigkeit besitzen, O^6 -Alkyl-Guanin aus der DNA zu entfernen (O'Connor et al. 1973, Goth u. Rajewsky 1974, Kleihues u. Margison 1974, Nicoll et al. 1975). Nach einer einmaligen Dosis von DMN entstehen in der Ratteniere Tumoren, nicht jedoch in der Leber (Magee u. Barnes 1967, Swann u. Magee 1968). Die Tatsache, daß DMN in der Leber in einem weit höheren Maße metabolisiert wird - somit die Alkylierung von Makromolekülen in der Leber auch beträchtlich höher ist -, steht dazu nur in scheinbarem Widerspruch. Nicoll et al. (1975) konnten für die Dosis von 20 mg/kg zeigen, daß O^6 meGua nach einem initialen Abfall von 30 % für 50 Std. in der Niere in einer deutlich erhöhten Menge nachweisbar war, wogegen O^6 meGua in der Leber kontinuierlich mit einer Halbwertszeit von etwa 20 Std. abgebaut wurde. Bei einer Dosis von 2,5 mg/kg wurde DMN in gleicher Weise wie in der Leber, wenn auch etwas langsamer von der Niere abgebaut.

In die gleiche Richtung weisen Untersuchungen von Kleihues u. Margison (1974), die die Persistenz von O^6 meGua in Gehirn, Leber und Niere nach Applikation von MNU untersuchten. Im Gehirn, dem Target-Organ von MNU, wurde O^6 meGua langsamer abgebaut als in der Leber. In der Niere, in der gelegentlich nach hohen Dosen von MNU Tumoren auftreten, lag die Abbaurate zwischen der der Leber und des Gehirns. Ähnliche Ergebnisse fanden Goth und Rajewsky (1974) für das Ethyl-Analogon von MNU N-ethyl-N-Nitrosoharnstoff.

Somit scheint ein entscheidender Faktor im Rahmen der Carcinogenese durch Nitrosamine die Fähigkeit von Organen zu sein, Methylierungsprodukte, insbesondere O^6 -Alkyl-Guanin, aus der DNA zu entfernen, bevor eine folgende Zellreplikation die Alteration

der Basensequenz fixiert. Die Aktivierung des Carcinogens aufgrund unterschiedlicher Metabolisierungsraten ist demgegenüber von untergeordneter Bedeutung.

1.1.6 Reparaturmechanismen für alkylierte DNA-Basen

Die Fähigkeit der Leber, in hohen Maße O^6 meGua abzubauen, scheint sie vor der Tumorinduktion durch einmalige Dosen alkylrierender Carcinogene zu schützen (Nicoll et al. 1975, Pegg 1977/b). Diese Reparaturfähigkeit ist jedoch dosisabhängig. Bei niedrigen Dosen von 0,01 bis 2,5 mg/kg ist der Reparaturmechanismus besonders effektiv, aber auch bei Dosen bis 20 mg/kg ist eine Reparaturaktivität nachweisbar (Pegg u. Hui 1978, Stumpf et al. 1979). Die Entstehung von Tumoren bei chronischer Applikation von Carcinogenen steht möglicherweise mit einer herabgesetzten Reparaturkapazität für O^6 meGua in Zusammenhang (Kleihues u. Margison 1976). Dagegen spricht die Beobachtung, daß chronische Applikation von Carcinogenen die Aktivität der Reparaturenzyme um das zwei- bis dreifache erhöht (Montesano et al. 1979, Pegg et al. 1981). Die Menge an promutagenem O^6 meGua sollte daher erniedrigt sein und somit auch die Wahrscheinlichkeit einer falschen Basenpaarung.

Ein mögliches Bindeglied zwischen der erhöhten Enzymaktivität bei chronischer Applikation und einem dennoch erhöhten O^6 meGua ist die Annahme, daß der Reparaturmechanismus erschöpfbar ist. Hinweise dafür ergeben sich aus neueren Untersuchungen:

Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die Leber als auch die Niere der Ratte über ein Protein verfügt, das den Transfer der Methylgruppe am O^6 meGua in der DNA auf einen Cystein-Rest eines Proteins katalysiert (Pegg et al. 1983). Eine Aktivität dieses auch Alkyl-Acceptor-Protein (AAP) genannten Moleküls (Svenberg et al. 1982) konnte in Extrakten von Escherichia Coli (Olsson u.

Lindahl 1980), der Rattenleber (Mehta et al. 1981) und der Rattenniere (Pegg u. Wiest 1983) nachgewiesen werden. Es besteht eine stöchiometrische Beziehung zwischen der Produktion von S-Methylcystein, der Bildung von Guanin und dem Verlust von O^6 me Gua von der DNA (Pegg u. Wiest 1983). Das Protein scheint nur einmalig zu arbeiten, da das Cystein am Acceptor-Protein nicht regeneriert wird (Lindahl 1982).

Da der Reparaturmechanismus irrtumsfrei ist, wenn das Carcinogen in kontinuierlichen kleinen Dosen gegeben wird (Robins u. Cairns 1979), ist eine Schwellendosis denkbar, oberhalb derer das Enzym erschöpft ist. Von dieser noch unbekannten Schwellendosis ab wird möglicherweise O^6 meGua nicht in ausreichender Menge eliminiert, so daß Tumorinitiation erfolgt.

1.2 Die Bedeutung der Zellproliferation bei der Carcinogenese

Neben der Menge und Persistenz von O^6 -Alkyl-Guanin und der Aktivität der Methyltransferase spielt die Proliferationsaktivität eines Organs eine maßgebliche Rolle bei der Nitrosamin-induzierten Carcinogenese. Die Bedeutung der Zellproliferation für die Initiation durch chemische Carcinogene (Rajewsky 1972, Craddock 1976) wird durch die Beobachtung unterstützt, daß verschiedene Carcinogene, die normalerweise keine Lebertumoren an adulten Ratten induzieren, eine carcinogene Wirkung entfalten, wenn sie als einmalige Dosis nach partieller Hepatektomie appliziert werden (Craddock 1971, Friedmann-Manduzio et al. 1977, Rabes 1979). Man nimmt an, daß durch die partielle Hepatektomie ein im Rahmen der Initiation durch ein Carcinogen induzierter DNA-Schaden durch die Replikation der geschädigten DNA fixiert wird (Cayama et al. 1978). Das Ausmaß dieses Schadens hängt maßgeblich von der Intensität der DNA-Reparaturmechanismen ab. Je kürzer das Intervall zwischen Läsion und Replikation der DNA ist, umso

wahrscheinlicher ist eine Störung im Ablauf der DNA- Synthese und eine Fixierung eines promutagenen Schadens (Rabes 1979).

Gerchman und Ludlum (1973) gehen davon aus, daß die DNA-Replikation über den durch das Carcinogen alterierten DNA-Strang hinwegläuft und zur Bildung fehlerhafter Strukturen im komplementären Strang führt.

Bei zellzyklus-bezogenen Untersuchungen im Rahmen der chemischen Carcinogenese hat sich die 1953 von Howard und Pelc erstmals vorgeschlagene Einteilung des Zellzyklus in die Phasen G_1 - S - G_2 - M bewährt. G_1 ist die präsynthetische Phase, S die DNA-Synthesephase, G_2 die prämitotische Phase und M die Mitosephase. Nach Rajewsky (1972) lassen sich im wachsenden und adulten Organismus bei den meisten Zellsystemen ein proliferierendes P-Kompartiment und ein nicht-prolierierendes Q-Kompartiment abgrenzen. Zellen des P-Kompartments durchlaufen den Zellzyklus, Zellen des Q-Kompartments scheinen außerhalb des Zellzyklus zu liegen. Unter G_0 -Zellen sind "non-cycling" Zellen zu verstehen, die nach einem proliferativen Stimulus wie z.B. einer partiellen Hepatektomie wieder in den Zellzyklus eintreten können und die Stadien G_1 - S - G_2 - M durchlaufen (Rajewsky 1972).

Der Zusammenhang zwischen der Position von Target-Zellpopulationen im Rahmen des Zellzyklus und deren Sensitivität gegenüber der initiierenden Wirkung chemischer Carcinogene ist am Modell der Rattenleber in zahlreichen Experimenten (Rabes 1979) untersucht worden.

Nach partieller Hepatektomie sind etwa 30 % der Hepatozyten in der S-Phase (Rabes 1976). Trotz der Heterogenität der Leberzellpopulation (Rabes 1978) führt eine DMN-Applikation zum Zeitpunkt der S-Phase zu einer höheren Inzidenz an Lebertumoren (Craddock 1971). Ein deutlich höherer Synchronisationsgrad läßt sich durch eine kontinuierliche intravenöse Infusion von Hydroxyharnstoff

(HU) erzielen (Rabes et al. 1977). Eine 30stündige HU-Dauerinfusion, die 14 Std. nach partieller Hepatektomie begonnen wird, führt durch eine Inhibition des Übergangs der Hepatozyten von der G_1 - in die S-Phase zu einem Anstieg der DNA-synthetisierenden Zellen auf mehr als 80 % (Rabes et al. 1977). Nach etwa 6,5 Std. treten die Zellen in die G_2 -Phase über. Anschließend erfolgt eine schnelle Desynchronisation der Zellzykluskompartimente (Rabes et al. 1975, Rabes et al. 1977). Dieses synchronisierte Modell der regenerierenden Rattenleber läßt zellzyklusspezifische Untersuchungen zu:

Ratten, denen nach partieller Hepatektomie DMN in der Dosis von 4 mg/kg in der G_0 -, G_1 -, S- und der G_2 M-Phase injiziert wurde, zeigten ein Maximum an Lebercarcinom-Inzidenz, wenn die Applikation von DMN während der synchronisierten DNA-Synthese erfolgte (Rabes 1979). Gibt man partiell hepatektomierten Ratten DEN in einer einmaligen Dosis von 40 mg/kg in der G_0 -, G_1 - oder der HU-synchronisierten S-Phase, so ist die Anzahl der Enzymdefektbezirke nach drei Monaten um das dreifache in der G_1 - und das achtfache in der S-Phase, verglichen mit der G_0 -Phase erhöht (Hartmann und Rabes 1982). Eine noch detailliertere Relation zwischen Zellzyklusexposition und Anzahl von präneoplastischen Enzymdefektbezirken konnte in Versuchen nachgewiesen werden, bei denen MNU in einer niedrigen Dosis von 25 mg/kg in verschiedenen Stadien der HU-synchronisierten Leber appliziert wurde (Müller und Rabes 1983). 24 Std. nach MNU Injektion wurde eine 30tägige Fütterung mit DEN in einer Dosis von 2 mg/kg/Tag im Trinkwasser angeschlossen. Es zeigte sich, daß die Größe der Enzymdefektbezirke nach 90 Tagen nicht signifikant differierte. Die Anzahl der EDB war jedoch in der späten G_1 -, aber vor allem in der frühen S-Phase signifikant erhöht. 3 Std. nach Beginn der DNA Synthese, also in der späten S-Phase sowie in der G_2 M-Phase führte MNU zu einer deutlich geringeren Anzahl von EDB.

Diese morphologisch orientierten Untersuchungen über die erhöhte Sensitivität DNA-produzierender Zellen gegenüber alkylierenden Carcinogenen lassen sich auch auf molekularer Ebene ausdehnen, indem man die Kinetik der Produktion und Elimination von alkylierten DNA-Basen untersucht. Es konnte wiederum an der HU-synchronisierten Rattenleber gezeigt werden, daß die Höhe des potentiell promutagenen O^6 meGua in der Leber nicht mit der Tumorzinidenz nach einer einmaligen Dosis von DMN korrelierbar ist (Rabes et al. 1979/b). Da die Menge an gebildetem 7 meGua in den verschiedenen Zellzyklusphasen G_0 , S, G_2M gleich ist (Rabes et al. 1979/b), spricht ein signifikant erniedrigter O^6 meGua / 7 meGua Quotient in der S-Phase für einen vermehrten Abbau des O^6 meGua. Dies konnte sowohl für eine einmalige Applikation von DMN (Rabes et al. 1982/b) und eine kontinuierliche DMN-Infusion (Rabes et al. 1983) gezeigt werden. Die erhöhte Reparaturkapazität von Zellen in der S-Phase ist aber offensichtlich dosisabhängig, da 120 Min. nach 1,43 mg/kg DMN die molare Fraktion von O^6 meGua um 60 % reduziert ist, bei 4 mg/kg jedoch nur um 35 % (Rabes et al. 1982/b).

Die Erschöpfbarkeit der Methyltransferase bei hohen Dosen wäre eine mögliche Erklärung dafür, daß Leberzellen, obwohl sie während der S-Phase über eine erhöhte Reparaturkapazität verfügen, gerade in dieser Phase des Zellzyklusses durch Carcinogene transformiert werden können.

1.3 Die Proliferationskinetik der verbleibenden Niere nach unilateraler Nephrektomie

Zellzyklusbezogene Untersuchungen im Rahmen der chemischen Carcinogenese an der regenerierenden Rattenniere sind nur möglich, wenn man den zeitlichen Ablauf der reaktiven Proliferation in den einzelnen Nierenabschnitten berücksichtigt.

Bei proliferationskinetischen Untersuchungen nach unilateraler Nephrektomie hat sich die Einteilung der Niere in vier Zonen (Mc Farlane 1941) bewährt. Die einzelnen Zonen I - IV erfassen dabei folgenden Anteile des Nephrons:

I. Stratum labyrinthicum

Hauptsächlich gewundene Hauptstücke (ca. 70 %) mit etwa 20 %igem Anteil des distalen Tubulus und 10 % weitem Anteil der Henle'schen Schleife sowie Sammelrohre

II. Stratum subcorticale

In erster Linie gerade Hauptstücke, geringe Zahl gewundener Hauptstücke und kleine Anzahl weiterer Anteile der Henle'schen Schleife sowie Sammelrohre

III. Zona intermedia

In erster Linie dicker aufsteigender Anteil der Henle'schen Schleife, in geringem Umfang dünner absteigender Teil und Sammelrohre

IV. Zona basalis

Hauptsächlich Sammelrohre, in geringem Ausmaß dünner Anteil der Henle'schen Schleife

Die Nierenepithelien gehören ebenso wie die Hepatozyten zu denjenigen Zellen des Organismus, die eine hohe cytoplasmatische

Differenzierung besitzen. Man findet in normalen Rattennieren bei autoradiographischen Untersuchungen nur selten DNA-synthetisierende Zellen. Der mittlere ^3H -Thymidin-Markierungsindex aller Tubuli beträgt 0,4 % (Noltenius et al. 1965). Die basale Proliferationsrate von jungen, sieben Wochen alten Tieren (Phillips u. Leong 1967) liegt bei 0,59 %, von erwachsenen, vier Monate alten Tieren bei 0,11 %. Heine und Stöcker (1971) stellten bei jungen adulten Ratten fest, daß der Markierungsindex von 0,67 % im stratum labyrinthicum auf 0,16 % in der zona basalis abfällt. Das Verhältnis von ^3H -markierten Zellen zu Mitosen liegt etwa bei 10 : 1 (Noltenius et al. 1965). Der ^3H -Markierungsindex und der Mitose-Index in der Rattenniere fällt mit zunehmendem Alter ab und erreicht bei einem Tiergewicht von 200 g und einem Alter von drei bis vier Monaten einen weitgehend konstanten Wert. Mit Beginn des physiologischen Zellersatzes wird somit ein "steady state" erreicht (Stöcker 1966).

Nach unilateraler Nephrektomie beginnt in der kompensatorisch regenerierenden Rattenleber die DNA-Synthese nach 20 - 26 Std. im stratum labyrinthicum und im stratum subcorticale. Nach 26 - 34 Std. sind in der Zone intermedia die ersten markierten Zellen nachweisbar, nach 30 - 38 Std. in der Zona basalis. Der Markierungsindex erreicht sein Maximum nach 32 - 38 Std. in den Zonen I und II, nach 50 - 62 Std. in den Zonen III und IV (Heine und Stöcker 1972). Somit beginnt die Zellproliferation nach dem Stimulus einer Uninephrektomie nicht gleichmäßig über das Nierenparenchym verteilt, sondern differiert stark in den einzelnen Zonen. Es setzt sich gleichsam eine Proliferationswelle durch das Nephron vom proximalen Tubulus über die Henle'sche Schleife zu den Sammelrohren hin fort (Hübner 1967, Heine et al. 1971).

Im Vergleich zu unbehandelten Tieren erreicht die Zellproliferation in der verbleibenden Niere einen fünf- bis achtfachen Wert (Heine u. Stöcker 1972). Das Ausmaß dieser Zellproliferation

unterliegt tageszeitlichen Schwankungen (Phillips u. Leong 1967). Bei Untersuchungen über die circadiane Rhythmik der Zellproliferation konnten Heine et al. (1971) feststellen, daß der Anstieg und das Maximum DNA-synthetisierender Zellen in der Dunkelperiode liegen; ein Maximum von Mitosen findet sich in den Morgenstunden. Anhand zweier Tierkollektive, von denen die eine Gruppe morgens um 7.00 Uhr $\pm$ 1,5 Std., die andere abends um 19.00 Uhr $\pm$ 1,5 Std. operiert wurde, konnten die oben genannten Autoren zeigen, daß das Maximum proliferierender Tubulusepithelien von 4 % bei den morgens operierten Tieren auf über 6 % bei den abends operierten Tieren ansteigt. Die Gipfelpunkte der Markierungsindex-Kurven traten jedoch bei beiden Tiergruppen nach 38 Std. auf. Daraus schlossen Heine et al., daß der Regenerationsimpuls zwar durch die Tageszeit modifiziert wird, sich aber gegen die diurnalen Schwankungen durchsetzt.

Noltenius et al. (1965), die keine Angaben über den genauen Operationszeitpunkt machen, aber alle Versuchstiere um 17.15 Uhr töteten, fanden bei 50 g schweren Ratten einen Markierungsindex von 3,8 bzw. 6,7 in der pars contorta der Hauptstücke am dritten postoperativen Tag. Einen zweiten schwächeren Gipfel beobachteten sie am achten Tag nach unilateraler Nephrektomie.

Neben den Tubulusepithelen beteiligen sich auch die intertubulären Bindegewebszellen und Gefäßendothelien sowie die Zellen der Glomerula und der Bowman'schen Kapsel an der kompensatorischen Hypertrophie. Das Maximum liegt ebenso am dritten postoperativen Tag (Noltenius et al. 1965). Auf eine vermehrte Proliferation der glomerulären Schlingenzellen wies auch Hübner (1967) hin. Die kompensatorische Nierenhypertrophie ist nach Noltenius et al. (1965) nach 20 Tagen abgeschlossen, nach Hübner (1967) endet das kompensatorische Wachstum der Tubulusepithelien erst nach fünf Wochen.

1.4 Fragestellung und Skizzierung des Versuchsmodells

Die Bedeutung der Proliferation für die Carcinogenese ist an der Rattenleber in zahlreichen experimentellen Untersuchungen analysiert worden (Rabes 1979).

In Anlehnung an das Modell der regenerierenden Rattenleber wurde durch eine unilaterale Nephrektomie eine Proliferationswelle in der verbleibenden Niere induziert, um die Interaktion von DMN mit den proliferierenden Zellen der Niere biochemisch zu bestimmen. Gleichzeitig wurde der Versuch gemacht, die Entstehung von Tumoren mit dem Applikationszeitpunkt zu korrelieren.

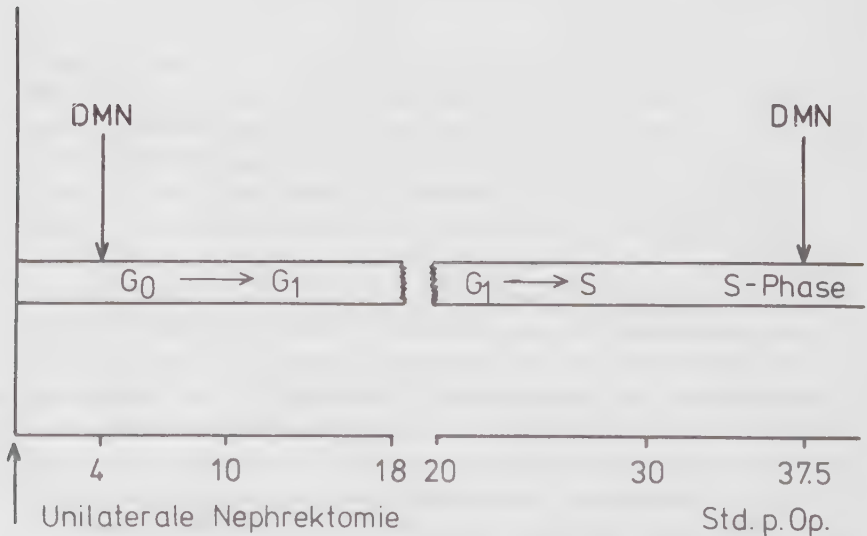


Abb. 1: Schematische Darstellung der Regeneration nach unilateraler Nephrektomie

Die schematische Darstellung (Abb. 1) zeigt den zeitlichen Ablauf der kompensatorischen Hyperplasie nach unilateraler Nephrektomie. Die Proliferation beginnt in der Niere nach 18 - 20 Std. und erreicht ihr Maximum nach 38 Std. im stratum labyrinthicum und stratum subcorticale (Heine und Stöcker 1972). 4 Std. nach Nephrektomie befinden sich die Zellen überwiegend im G_1 -Kompartiment.

Es wurden zwei Gruppen von Tieren gebildet:

Die erste Gruppe bekam DMN in der G_1 -Phase (4 Std. nach der Operation) in einer einmaligen Dosis intraperitoneal injiziert, die zweite Gruppe erhielt das Carcinogen zum Zeitpunkt der maximalen DNA-Synthese (37,5 Std. nach Nephrektomie). Als Zeitpunkt für die unilaterale Nephrektomie wurde für alle Versuchstiere 19.00 Uhr $\pm$ 1,5 Std. gewählt. In Anlehnung an das Versuchsmodell von Heine et al. (1971) sollte dadurch ein Maximum an proliferierenden Zellen in der S-Phase erzielt werden.

Im ersten Teil der Arbeit soll untersucht werden, ob zellzyklus-spezifische Unterschiede im Alkylierungsmuster der DNA Basen für die Dosen 2, 10, 20 und 30 mg DMN je kg KG bestehen. Insbesondere soll die Höhe und Persistenz der Alkylierung am O^6 des Guanin, einer potentiell promutagenen Basenalteration (Loveless 1969), genauer analysiert werden. 4 Std. (G_1 -Phase) bzw. 37,5 Std. (S-Phase) nach unilateraler Nephrektomie erhielten Ratten eine einmalige Injektion von radioaktiv markiertem DMN. 8 Std. nach der Injektion wurden die Tiere getötet, die Nieren entnommen und homogenisiert. Die DNA wurde nach der Methode von Kirby isoliert und die DNA Basen nach schwach saurer Hydrolyse säulenchromatographisch getrennt. Der Gehalt der Fraktionen an Guanin und Adenin wurde photometrisch ermittelt. Nach Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurden die Mengen an methylierten und nicht-methylierten Basen anhand der molaren Fraktionen von Guanin und Adenin errechnet.

Im zweiten Teil der Arbeit soll für gleiche Expositionszeitpunkte (4 bzw. 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie) untersucht werden, ob nach DMN-Injektion von 10, 20 und 30 mg/kg zellzyklusspezifische Unterschiede in der Tumorzinzidenz bestehen.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchung wurde an insgesamt 88 männlichen Wistar AF/Han Ratten (204 - 234 g) durchgeführt, die eine Altromin-Standarddiät (Altromin, Lage, Lippe) und Trinkwasser ad libitum erhielten.

2.2 Operatives Vorgehen

In Äthernarkose wurde durch einen Lendenschnitt der Bauchraum eröffnet. Die linke Niere wurde durch die Bauchdecke luxiert, die Nierenkapsel unter Schonung der Nebenniere gespalten, und der Nierenstiel mit einer einfachen Ligatur unterbunden. Nach Abtragen der Niere erfolgte ein zweischichtiger Wundverschluß. Die durchschnittliche Dauer des Eingriffs betrug 10 Minuten. Alle Versuchstiere wurden um 19.00 Uhr $\pm$ 1,5 Std. operiert.

2.3 Durchführung des Versuchs

Die Untersuchungen wurden in drei Versuchsreihen durchgeführt. In jeder Versuchsreihe wurde Gruppen von Tieren ^{14}C DMN (New England Nuclear Corp., Boston, Mass.) 4 Std. (G_1 -Phase) bzw. 37,5 Std. (S-Phase) nach unilateraler Nephrektomie in einer einmaligen Dosis von 2, 10, 20 oder 30 mg/kg intraperitoneal injiziert:

	Dosis DMN (mg/kg)	G ₁ -Phase 4 Std.	S-Phase 37,5 Std.
1. Versuchsreihe	10	3	3
	20	3	3
	30	3	3
2. Versuchsreihe	2	5	5
	10	5	5
	20	5	5
	30	5	5
3. Versuchsreihe	2	8	8
	10	6	-

Tab. 1: Übersicht über die applizierten Dosen, Injektionszeitpunkte und Anzahl der operierten Tiere in den einzelnen Versuchsreihen

Die spezifische Aktivität des vom Handel gelieferten radioaktiv markierten DMN betrug in der ersten Versuchsreihe 46,8 mCi/mMol, in der zweiten Serie 50,9 mCi/mMol, in der dritten Serie 47,0 mCi/mMol.

Um die benötigten DMN-Konzentrationen zu erhalten, wurde dem ¹⁴C DMN nicht markiertes DMN (E. Merck AG, Darmstadt) hinzugefügt, so daß sich für die jeweiligen Tiergruppen folgende spezifische Aktivität der injizierten Lösung ergab (Tab. 2):

Dosis DMN (mg/kg)	Spezifische Aktivität (mCi/mMol)
2	11,0
10	2,04
20	1,02
30	0,68

Tab. 2: Spezifische Aktivität des ^{14}C DMN in den unterschiedlichen injizierten Dosen

Jedes Versuchstier erhielt eine Radioaktivitätsdosis von 55 $\mu\text{Ci}/200\text{ g}$ bei einem Injektionsvolumen von 0,75 ml/200 g KG.

2.4 Tötung der Tiere und Nierenentnahme

8 Std. nach DMN-Injektion wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet und die Nieren entnommen.

In der ersten Versuchsreihe wurden die Nieren nach der Entnahme sofort in eiskalten SSC-Puffer (0,15 Mol NaCl und 0,015 Mol $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) gelegt. Anschließend wurden sie gewogen und im fünf-fachen ihres Gewichts in eiskaltem SSC-Puffer mit einem Glas-Teflonhomogenisator im Eisbad homogenisiert. Die einzelnen Homogenate wurden bis zu ihrer Vereinigung im Kühlschrank für maximal 30 Min. bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurde das Homogenat der drei Nieren vereinigt und bei 4 °C und 2500 U/Min. zentrifugiert. Der RNA-haltige Überstand wurde bei -70 °C tiefgefroren. Das die DNA enthaltende Pellet wurde zweimal in SSC-Puffer mit dem 2,5fachen Volumen des Nierengewichts (ml Vol/g Gew.) gewaschen und rezentrifugiert. Das Kernpellet wurde bis zur Ver-

arbeitung bei -70°C tiefgefroren. In der zweiten und dritten Versuchsreihe wurden die einzelnen Nieren sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Diese Methode wurde gewählt, um mögliche enzymatische Einwirkungen auf die DNA während der Vereinigung der drei Nierenhomogenate auszuschließen. Die tiefgefrorenen Nieren wurden angetaut, vereinigt und in analoger Weise zur ersten Versuchsreihe weiterverarbeitet.

2.5 DNA-Isolierung

In allen Versuchsreihen wurde die DNA aus dem Pellet nach der Methode von Kirby (1957) gewonnen, die von Swann und Magee (1968) modifiziert wurde.

Das Pellet wurde angetaut und in einem Glashomogenisator bei 4°C in 1 molarem NaCl (10 ml/g Niere) homogenisiert. Nach Zugabe von 10 %iger Na-Dodecylsulfat-Lösung (1 ml/g Niere) wurde sofort Kirby-Reagenz (500 g Phenol, 70 ml m-Kresol, 0,5 g 8-Hydroxychinolin, 55 ml H_2O ; 10 ml/g Niere) beigemischt und bei Zimmertemperatur 30 Min. geschüttelt. Anschließend wurde in einer Beckmann J-21 B Zentrifuge (Rotor JA-20, 4° , 12000 U/Min.) zentrifugiert und der klare wässrige Überstand, in dem sich die DNA befindet, abpipettiert. DNA liegt in der wässrigen Phase des Zentrifugats als Na^+ Salz vor. Zum Ausfällen der DNA wurde Äthanol in gleicher Menge zugegeben. Die DNA wurde mit einem Glasstab als feinfädiges Netz entnommen und in Natriumcitrat (2,5 mg/g Niere) aufgelöst. Nach Zugabe von einer Spatelspitze Rinderpankreas RNA-ase (40 i.E./mg, Boehringer, Mannheim) wurde die Lösung 15 Min. bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Die DNA wurde unter Zugabe von Aethoxyethanol (2,5 ml/g Niere) gefällt, entnommen und in Wasser (2 ml/g Niere) gelöst. Sodann wurden dem Volumen der Lösung entsprechende Mengen H_2O , K_2HPO_4 und Methoxy-

Äthanol beigelegt und 30 Min. gekühlt und anschließend 30 Min. bei 4 °C und 2100 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit einer äquivalenten Menge 1 %iger CetAB-Lösung (= Cetyl-Trimethyl-Ammonium-Bromid; $C_{19}H_{42}BrN$) vermischt. Dabei wird das Na^+ -Salz gefällt; Natrium wird durch das hydrophobe, in Äthanol lösliche Cetyl ersetzt. Die ausgefällte DNA wurde zweimal in Wasser gewaschen. Durch Inkubation (15 Min.) in alkoholischem Na^+ Acetat wird das Cetyl wieder durch Na^+ ersetzt und erneut durch Alkohol (10 ml) ausgefällt.

Die DNA wurde schließlich in einem Äthanol/Diäthyläthergemisch und zweimal in Diäthyläther gewaschen. Die gereinigte DNA wurde im Vakuum getrocknet, gewogen und bei 4 °C aufbewahrt.

2.6 Isolierung der Basen aus der DNA und Radioaktivitätsnachweis

Die DNA wurde einer milden Hydrolyse in 0,1 n HCl (1,5 mg DNA/ml HCl) für die Dauer von 20 Std. bei 37 °C unterzogen. Sodann wurde der pH unter tropfenweiser Zugabe von 1 n NaOH auf 6,8 eingestellt und das Hydrolysat ein bis zwei Minuten bei 1500 U/Min. zentrifugiert. 5 ml des Hydrolysats wurden auf eine Sephadex G 10 Säule (90 x 1,5 cm, Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetragen und mit Ammoniumformiat-Puffer (0,05 molar; pH 6,8) eluiert. 130 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 4,9 ml wurden gesammelt und die Extinktion ($d = 1$ cm, $\lambda = 260$ nm) in einem Zeiss PM Q II Spektrophotometer gemessen. Jeder Fraktion wurden 8 ml Szintillationsflüssigkeit (Insta-Gel II, Packard, Frankfurt/Main) beigelegt und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard Instruments, Downers Grove, Ill.) bestimmt. Die Meßdauer je Probe betrug 10 Min.

Die im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessene Radioaktivität wurde für jede der 130 Proben in cpm ausgedruckt. Im Bereich der

Fraktionen 111 - 130, in denen das Eluat keine Radioaktivität enthält, wurde die Backgroundaktivität als Mittelwert der cpm-Werte ermittelt.

Um die aktuelle Zählrate des Flüssigkeitsszintillationszählers zu errechnen, wurde ein interner Standard (^{14}C -O, J.T. Baker Chem., Deventer, Holland, 53600 dpm) mitgemessen. Aus der Relation zwischen zugesetzter Radioaktivität und Meßwert konnte die Ausbeute berechnet werden. Sie betrug im Mittel 81 %. Dieser Wert wurde bei der Berechnung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen verwendet.

Die aus den Peaks der Radiochromatogramme errechneten Mengen an methylierten Basen wurden nach der Methode von Swann und Magee (1968) ermittelt, bei der die Identität der spezifischen Aktivität der methylierten Basen und des radioaktiv markierten DMN angenommen wird. Die gleiche Methode wurde zur Bestimmung der Menge an radioaktiv markiertem Guanin und Adenin verwendet. Die methylierten und nicht-methylierten Basen wurden in molaren Fraktionen von Guanin und Adenin ausgedrückt.

2.7 Zusatzversuch: Autoradiographische Untersuchung zur Zellproliferation der verbleibenden Niere zum Zeitpunkt der DNA-Isolierung

2.7.1 Versuchstiere

Insgesamt 16 männliche Wistar AF/Han Ratten mit einem Gewicht von 215-230 g wurden unilateral nephrektomiert. Jeweils zwei Ratten erhielten DMN (Merck AG, Darmstadt) in einer Dosis von 2, 10, 20 oder 30 mg/kg entweder in der G_1 -Phase (4 Std. p.Op.) oder S-Phase (37,5 Std. p.Op.) in einer einmaligen Dosis intraperitoneal injiziert.

2.7.2 ³H-Thymidin-Pulsmarkierung

Um die DNA-Synthese der ruhenden und regenerierenden Rattenniere zum Zeitpunkt der DNA-Isolierung zu bestimmen, wurde Tritium-markiertes Thymidin (spezifische Aktivität 5 Ci/mMol, Radiochemical Centre, Amersham) mit steriler Kochsalzlösung auf eine Konzentration von 200 µCi/ml verdünnt und in einer Dosis von 0,8 µCi/g KG intraperitoneal injiziert. Die Injektion erfolgte 7 Std. nach Applikation des DMN. Eine Stunde später wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet und die Nieren entnommen.

2.7.3 Herstellung der histologischen Präparate und der Autoradiographien

Die entnommenen Nieren wurden in der Ebene des Hilus längs geteilt und in 10 %igem Formalin unter Zugabe von 0,1 mg/ml inaktivem Thymidin fixiert. Nach Paraffin-Einbettung wurden 2 µ Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte in der Dunkelkammer bei 60 % Luftfeuchtigkeit und 20 °C Raumtemperatur in eine auf 45 °C erwärmte und 1 : 1 mit Aqua dest. verdünnte photoempfindliche Emulsion (Ilford K 2, Essex, England) getaucht. Die Objektträger wurden 2 Std. luftgetrocknet und 14 Tage bei 4 °C im Kühlschrank bei völliger Dunkelheit exponiert. Im Anschluß daran wurden die Schnitte 12 Min. entwickelt, kurz gewässert, 3 - 5 Min. fixiert und nochmals 20 - 30 Min. unter fließendem Wasser gewässert. Schließlich erfolgte ein letztes Abspülen mit destilliertem Wasser, Lufttrocknung für 24 Std. und Färbung nach Harris (Hämatoxylinlösung 30 Min. 20 Sek. Differenzierung in 1 % HCl Alkohol, 20 Min. wässern, Gegenfärbung mit 0,5 %igem Eosin für 3 Min., aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Eindeckung mit Deckgläsern Nr. 0 in Eukitt).

2.7.4 Auswertung der Autoradiographien

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Rasterokulars bei 400-facher Vergrößerung (Okular 10fach, Ölimmersions-Objektiv 40-fach). In jedem Präparat wurden für jede der vier Zonen der Niere (stratum labyrinthicum, stratum subcorticale, zona intermedia, zona basalis) 1000 Zellen mäanderförmig ausgezählt. Interstitielle Zellen und Endothelzellen wurden nicht berücksichtigt.

Um die Background-Markierung, die durch nicht in die DNA eingebauten Thymidin sowie geringe unspezifische Schwärzung der Emulsion bedingt ist, zu berücksichtigen, wurde die Anzahl der Silbergranula im Parenchym außerhalb der Zellkerne bestimmt. Als markiert wurde eine Zelle gewertet, wenn über dem Kern mindestens die dreifach höhere Anzahl von Silbergranula als auf einer einem Kern entsprechenden Fläche in der unspezifischen Hintergrundmarkierung vorhanden war.

Bei allen Tieren wurden Präparate nach 14tägiger Exposition ausgewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Berechnung der molaren Mengen an Adenin und Guanin sowie der Gesamtaktivität der DNA-Hydrolysate

Aus den photometrisch ermittelten Extinktionswerten für Adenin und Guanin wurde nach dem molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ für Guanin = $7,2 \times 10^6$, ϵ für Adenin = $13,4 \times 10^6$) die molare Konzentration von Adenin und Guanin berechnet (Tab. 3). Da das Verhältnis von Adenin und Guanin konstant ist, kann der Ad/Gua-Quotient als innerer Standard herangezogen werden. Mit Ausnahme eines Wertes liegen alle Ad/Gua-Quotienten im Bereich von 1,23 bis 1,35.

Betrachtet man die Radioaktivität je mg DNA, d.h. die spezifische Aktivität der DNA (Tab. 3), so fällt auf, daß die Werte für die Tiergruppen, die DMN nach 37,5 Std. erhielten, höher liegen, als die der nach 4 Std. injizierten. Als Erklärung ist die während der DNA-Synthese vermehrte Inkorporation aus dem radioaktiv markierten C-1-Pool anzunehmen. Die einzige Ausnahme (30 mg/kg (3)^b) ist auf einen Fehler bei der Präparation des DNA-Hydrolysats zurückzuführen, wobei etwa 35 % der hydrolysierten DNA verloren gingen.

Die spezifische Aktivität der DNA, bezogen auf die Dosis (Tab. 4), nimmt bei den in der S-Phase (37,5 Std.) injizierten Tiergruppen ab der Dosis von 10 mg/kg DMN mit steigender Dosis ab. Diese Unterschiede bestehen für die G₁-Phase (4 Std.) nicht. Hohe toxische Dosen führen möglicherweise selektiv in der S-Phase zu einem vermehrten Zellverlust und damit zu einer Verringerung der nachgewiesenen Radioaktivität. Zudem sind Verdünnungseffekte aufgrund der Abnahme der spezifischen Aktivität mit

Dosis DMN (mg/kg)	Tierzahl	Einwaage (mg DNA)	Mol Adenin (x 10 ⁻⁶)	Mol Guanin (x 10 ⁻⁶)	Quotient (Ad/Gua)	Gesamtaktivität (dpm)	dpm/mg DNA
2	(5) ^a	4,06	2,40	1,92	1,25	1776	437
2	(5) ^b	4,50	2,51	2,00	1,25	4815	1070
2	(8) ^a	4,12	2,38	1,87	1,27	2155	523
2	(8) ^b	-	2,46	1,91	1,29	4249	-
10	(3) ^a	3,00	1,67	1,31	1,28	1476	495
10	(3) ^b	2,53	1,41	1,09	1,29	2638	1043
10	(5) ^a	2,35	1,40	1,10	1,28	1561	664
10	(5) ^b	4,59	2,33	1,90	1,23	11359	2474
10	(6) ^a	3,22	1,92	1,52	1,26	1989	618
20	(3) ^a	2,19	1,29	0,96	1,35	1300	594
20	(3) ^b	4,32	1,39	1,36	1,01	2687	623
20	(5) ^a	3,66	1,80	1,49	1,27	2134	583
20	(5) ^b	5,03	2,82	2,22	1,27	4775	949
30	(3) ^a	3,53	2,08	1,61	1,29	1929	547
30	(3) ^b	4,21	1,26	0,99	1,27	1369	325*
30	(5) ^a	3,05	2,01	1,55	1,30	2109	691
30	(5) ^b	2,52	1,59	1,26	1,26	2031	806

Tab. 3: Übersicht über die Ausbeute an den Purinbasen Adenin und Guanin und deren relatives Verhältnis zueinander sowie über die Gesamtaktivität der Eluate und Aktivität/mg DNA je Dosis.

a = DMN 4 Std. p.Op., b = DMN 37,5 Std. p.Op.

* = Versuch mit versehentlichem Teilverlust an DNA-Hydrolysat

steigender Dosis zu berücksichtigen, da die spezifische Aktivität des ^{14}C DMN invers in die spezifische Aktivität der DNA eingeht.

Dosis DMN (mg/kg)	Spez. Aktivität ^{14}C DMN (mCi/mMol)	Spez. Aktivität DNA ^a (dpm/mg DNA)	
2	11,0	G ₁	480
		S	1070
10	2,07	G ₁	592
		S	1759
20	1,02	G ₁	589
		S	786
30	0,68	G ₁	619
		S	566

Tab. 4: Beziehung zwischen der spezifischen Aktivität des ^{14}C -DMN und der spezifischen Aktivität der DNA bei verschiedenen Dosen in der G₁-Phase und der S-Phase
^a = Mittelwerte aus Tab. 3

3.2 Radiochromatographische Trennung der DNA-Basen

Bei einer graphischen Darstellung der Radioaktivität und der photometrisch ermittelten Extinktion der einzelnen Fraktionen ergibt sich folgendes Bild (Abb. 2 - 9):

Der erste photometrisch ermittelte Peak entspricht den Pyrimidinen, die beiden kleineren dem Guanin und Adenin.

Bei der Darstellung der Radioaktivität (cpm) der einzelnen Fraktionen findet sich der erste Gipfel im Bereich der Pyrimidine.

Die folgenden drei kleineren Peaks (Fraktionen 20 - 25, Fraktionen 26 - 34, Fraktion 35 - 39) sind noch nicht identifiziert.

Die alkylierten sowie die nicht-alkylierten Basen erscheinen in folgenden Fraktionen:

Fraktion 40 - 45: 3-Methyl-Adenin (3 meAd)

Fraktion 46 - 57: 7-Methyl-Guanin (7 meGua)

Fraktion 58 - 71: Guanin

Fraktion 72 - 89: Adenin

Fraktion 90 - 110: O⁶-Methyl-Guanin (O⁶ meGua)

Da der Wert am Wendepunkt der beiden Peaks für 3 meAd und 7 meGua stets über dem Background liegt, wurde er beiden Fraktionen jeweils zur Hälfte zugerechnet.

Vergleicht man die Radiochromatogramme der ruhenden (Abb. 2, 4, 6, 8) und der proliferierenden Niere (Abb. 3, 5, 7, 9), so erkennt man, daß in der S-Phase im Gegensatz zur G₁-Phase ein starker metabolischer Einbau von ¹⁴C Metaboliten in die DNA Purine Adenin und Guanin nachweisbar ist. Aufgrund der basalen Proliferationsrate der Niere kommt es auch in der G₁-Phase zum Einbau von markierten Vorläufern des radioaktiven C-Pools in die beiden Purinbasen.

Die Zellzykluskompartimentierung ist somit weniger deutlich ausgeprägt als an der HU-synchronisierten Rattenleber (Rabes et al. 1979/b).

Neben 3 meAd, das in geringerer Menge nachweisbar ist, stellen 7 meGua und O^6 meGua die Hauptalkylierungsprodukte der Purinbasen dar. Für die Dosis 2 mg/kg (Abb. 2) ist die Ausbeute an O^6 meGua in der G_1 -Phase relativ niedrig. Der Kurvenverlauf entspricht annähernd dem Mittelwert der Meßwerte. Um die im Bereich von O^6 meGua gemessenen cpm Werte sicher vom Background abgrenzen zu können, wurde ein U-Test durchgeführt, der den verteilungsfreien Medianvergleich für nicht-normalverteilte Kollektive ermöglicht. Für die ermittelten Werte ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Median-Werten mit $p \leq 0,05$. Da die auf die Säule aufgetragenen DNA-Mengen in den einzelnen Versuchsgruppen unterschiedlich waren, sind beispielsweise die Peaks für O^6 meGua nicht unmittelbar vergleichbar. Dies ist nur bei einer Berechnung der molaren Mengen möglich.

3.3 Berechnung der molaren Mengen der Alkylierungsprodukte

Ein mCi entspricht einer Zerfallsrate von $2,22 \times 10^9$ dpm. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität je Dosis ergeben sich folgende dpm/mMol für die jeweiligen Dosen:

Dosis DMN (mg/kg)	Spezifische Aktivität ^{14}C DMN (mCi/mMol)	dpm/mMol ($\times 10^9$)
2	11,0	24,42
10	2,07	4,52
20	1,02	2,26
30	0,68	1,51

Dividiert man die Summe der dpm der einzelnen Peaks durch die dpm/mMol für die jeweilige Dosis, so ergeben sich die molaren Mengen ($\times 10^{-12}$) der Alkylierungsprodukte. Die methylierten und nicht-methylierten Basen werden in molaren Fraktionen von Adenin und Guanin ausgedrückt.

Abb. 2: Radiochromatogramm eines Hydrolysats aus 4,2 mg DNA 8 Std. nach Injektion von 2 mg/kg ^{14}C DMN (spez. Aktivität 11,0 mCi/mMol) in der G_1 -Phase

Abb. 3: Radiochromatogramm eines Hydrolysats aus 4,5 mg DNA 8 Std. nach Injektion von 2 mg/kg ^{14}C DMN (spez. Aktivität 11,0 mCi/mMol) in der S-Phase

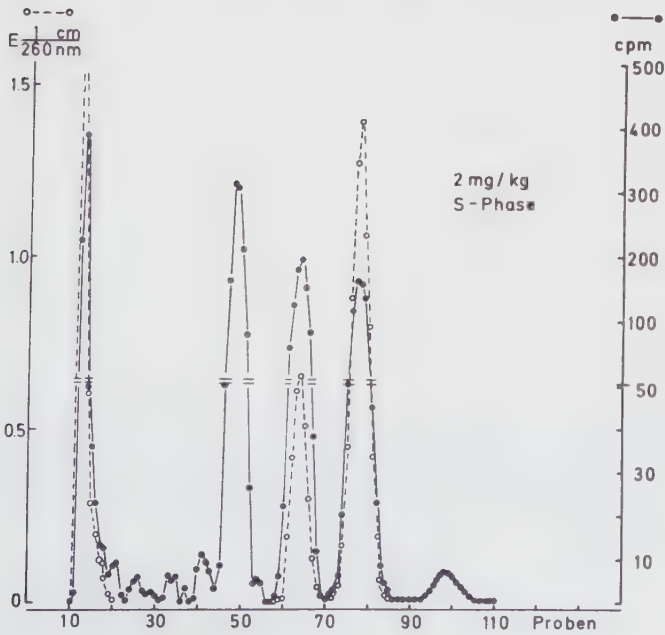
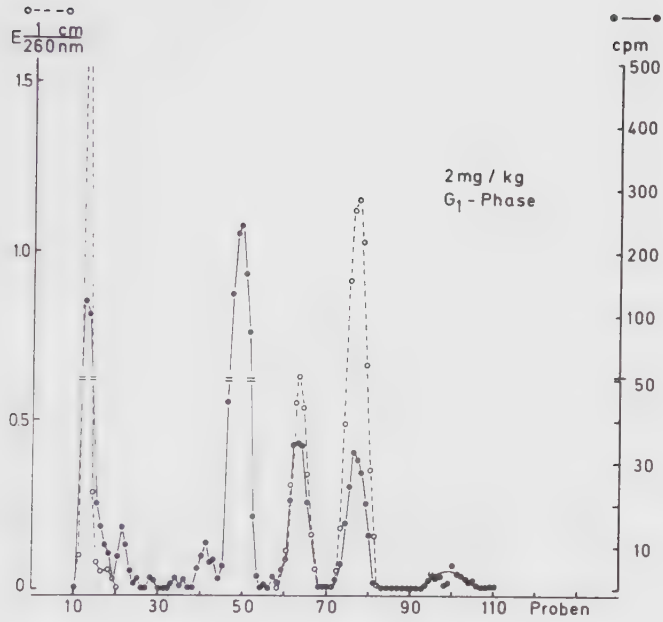


Abb. 4: Radiochromatogramm eines Hydrolysats aus 2,35 mg DNA 8 Std. nach Injektion von 10 mg/kg ^{14}C DMN (spez. Aktivität 2,07 mCi/mMol) in der G_1 -Phase

Abb. 5: Radiochromatogramm eines Hydrolysats aus 2,53 mg DNA 8 Std. nach Injektion von 10 mg/kg ^{14}C DMN (spez. Aktivität 2,07 mCi/mMol) in der S-Phase

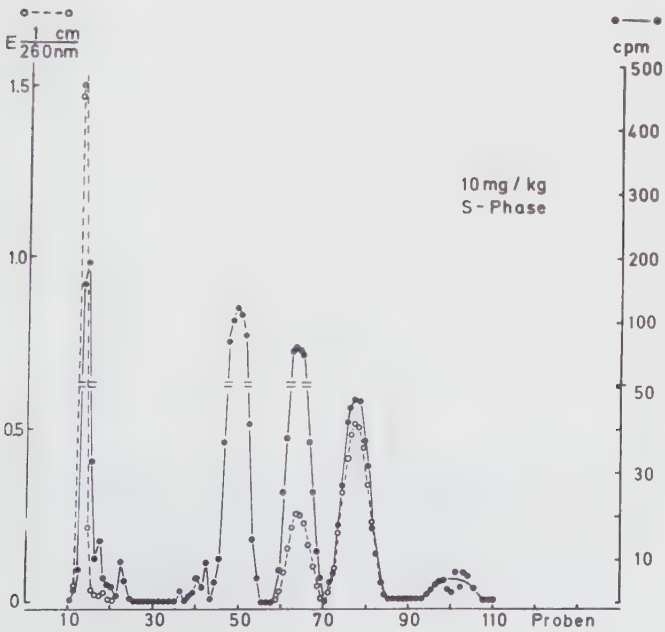
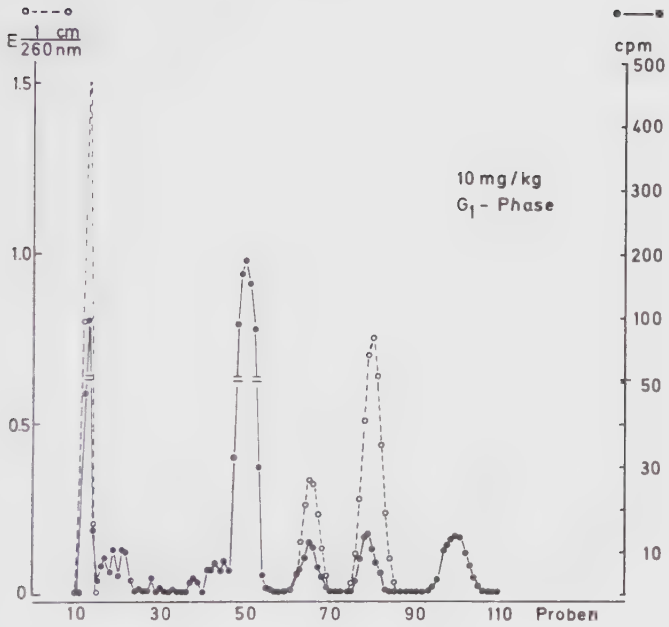


Abb. 6: Radiochromatogramm eines Hydrolysats aus 3,66 mg DNA 8 Std. nach Injektion von 20 mg/kg ^{14}C DMN (spez. Aktivität 1,02 mCi/mMol) in der G_1 -Phase

Abb. 7: Radiochromatogramm eines Hydrolysats aus 5,03 mg DNA 8 Std. nach Injektion von 20 mg/kg ^{14}C DMN (spez. Aktivität 1,02 mCi/mMol) in der S-Phase

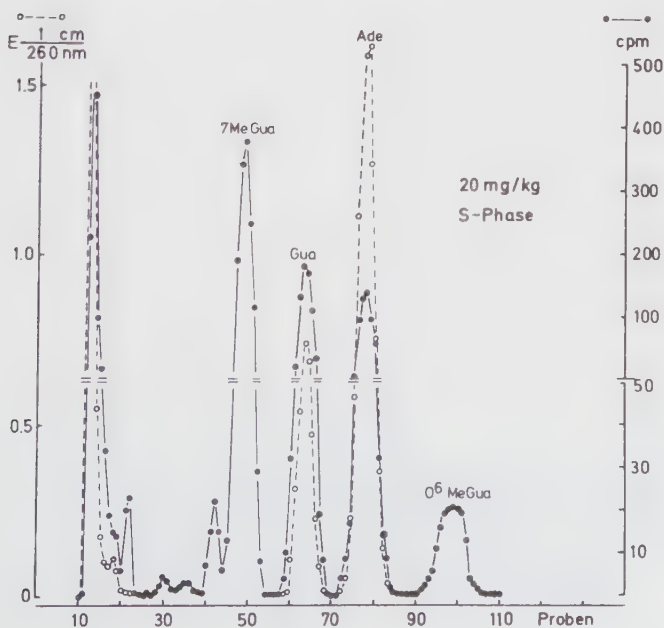
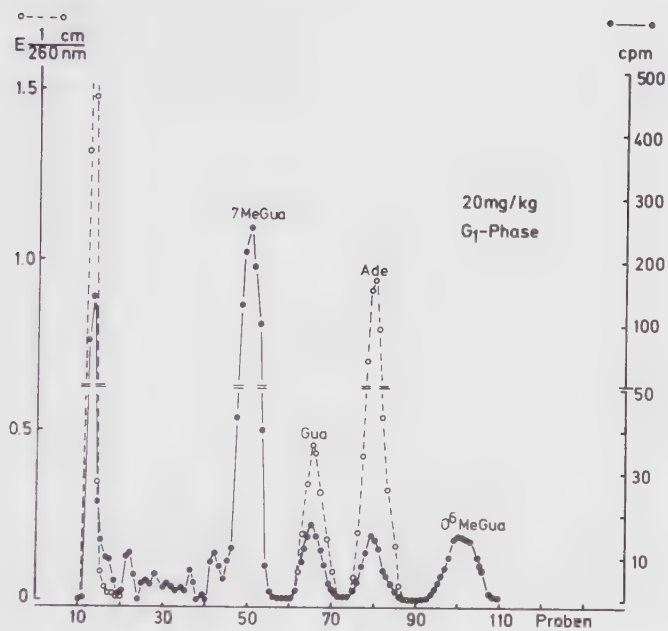
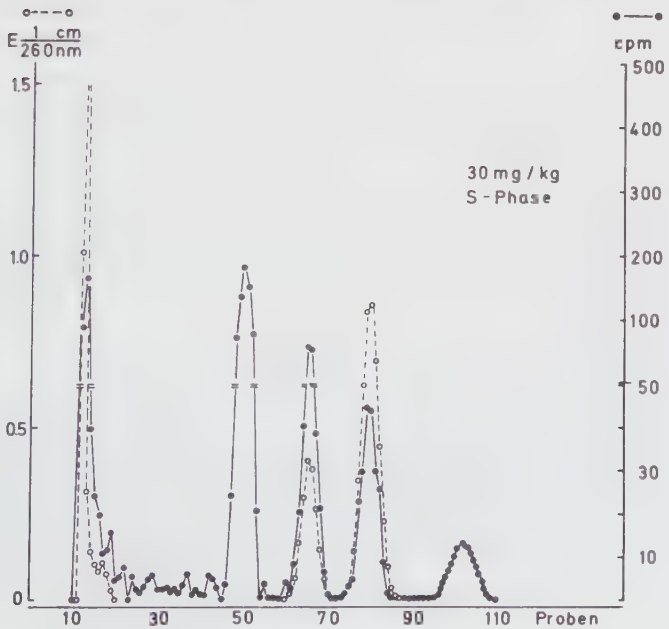
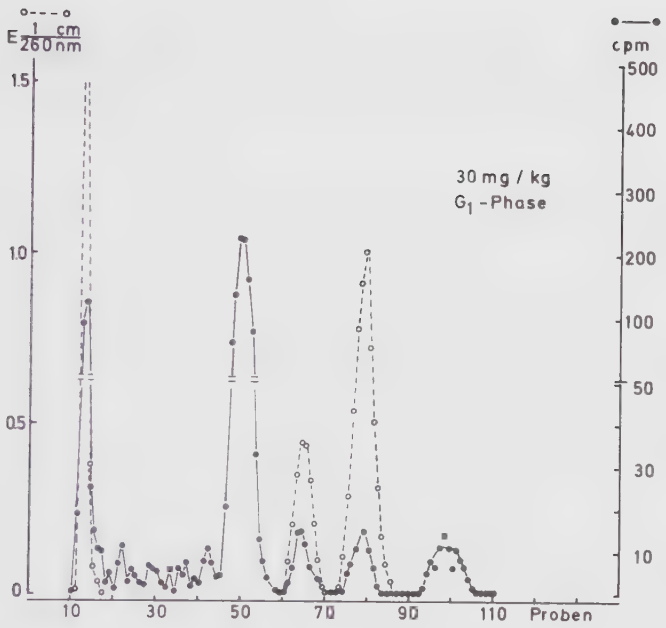


Abb. 8: Radiochromatogramm eines Hydrolysats aus 3,05 mg DNA 8 Std. nach Injektion von 30 mg/kg ^{14}C DMN (spez. Aktivität 0,68 mCi/mMol) in der G_1 -Phase

Abb. 9: Radiochromatogramm eines Hydrolysats aus 2,52 mg DNA 8 Std. nach Injektion von 30 mg/kg ^{14}C DMN (spez. Aktivität 0,68 mCi/mMol) in der S-Phase



3.4 Beziehung zwischen der Dosis des applizierten DMN und der molaren Fraktion alkylierter Basen

Die Methylierung am N7 des Guanin erfolgt nahezu linear zur Dosis (Tab. 5, Abb. 10). Bei der Dosis von 2 mg/kg sind die Werte für die G_1 - und S-Phase nahezu identisch. Für die höheren Dosen ist die Methylierung in der S-Phase etwas geringer als in G_1 . Dies ist möglicherweise auf eine erhöhte Sensibilität DNA-synthetisierender Zellen gegenüber der toxischen Wirkung von DMN zurückzuführen. Andererseits muß auch eine relative Dilution der Alkylierungsprodukte durch die laufende DNA-Synthese berücksichtigt werden. Die molare Fraktion des potentiell promutagenen O^6 meGua liegt in der G_1 - und der S-Phase etwa um den Faktor 10 niedriger als die für 7 meGua (Tab. 5, Abb. 11). Dabei sind die Werte bei Dosen von 10 und 20 mg/kg in der S-Phase etwas geringer als in G_1 . Für O^6 meGua wurde in der Rattenniere eine zur Rattenleber analoge Methyltransferase nachgewiesen, deren Aktivität nach unilateraler Nephrektomie um das 2,5fache ansteigt (Pegg u. Wiest 1983). Da die aufgeführten Werte die Situation 37,5 - 45,5 Std. nach Uninephrektomie widerspiegeln, könnte die Erniedrigung des O^6 meGua in der S-Phase Ausdruck einer erhöhten Reparaturkapazität der proliferierenden Nierenzellen sein.

Sowohl für die Bestimmung des O^6 meGua als auch für 7 meGua ist zu berücksichtigen, daß die DNA-Synthese auch nach der Alkylierung weiterläuft. Dies ist aus dem Einbau von markierten Kohlenstoffatomen in Adenin und Guanin (Abb. 3, 5, 7, 9) ersichtlich.

Die Bildung und Eliminierung alkylierter Basen kann nur beurteilt werden, wenn man neben der DNA-Synthese und der DNA-Reparaturkapazität einen möglichen Zellverlust berücksichtigt. Toxische Wirkungen von DMN sind bei der Dosis von 20 mg/kg denkbar und mit großer Wahrscheinlichkeit bei 30 mg/kg vorhanden und könnten das Alkylierungsmuster beeinflussen. Bei dem vorliegen-

Dosis (mg/kg)	Zellzyklusphase	Tierzahl	7 meGua (x 10 ⁻⁵)	O ⁶ meGua (x 10 ⁻⁶)	3 meAd (x 10 ⁻⁶)	O ⁶ meGua/7 meGua (x 10 ⁻²)	3 meAd/7 meGua (x 10 ⁻²)
2	G ₁	5	2,29	0,43	0,40	1,87	1,75
2	G ₁	8	2,50	0,91	0,79	3,64	3,16
2	S	5	2,97	1,10	0,78	3,69	2,63
2	S	8	2,04	0,75	0,65	3,67	3,19
10	G ₁	3	18,21	-	3,51	-	1,93
10	G ₁	5	18,63	21,04	5,80	11,29	3,11
10	G ₁	6	15,13	18,13	5,70	11,98	3,76
10	S	3	14,87	11,01	5,01	7,40	3,37
10	S	5	14,22	12,53	5,29	8,81	3,72
20	G ₁	3	39,51	40,79	14,29	10,32	3,61
20	G ₁	5	36,64	47,46	13,56	12,96	3,70
20	S	3	34,34	37,36	17,57	10,88	5,12
20	S	5	33,84	34,73	11,92	10,26	3,52
30	G ₁	3	50,61	63,01	18,52	12,45	3,66
30	G ₁	5	52,61	49,44	15,42	9,40	2,93
30	S	3	38,39	47,18	8,91	12,28	2,32
30	S	5	41,82	50,01	9,23	11,96	2,20

Tab. 5: Alkylierungsprodukte der DNA nach Applikation von ¹⁴C DMN

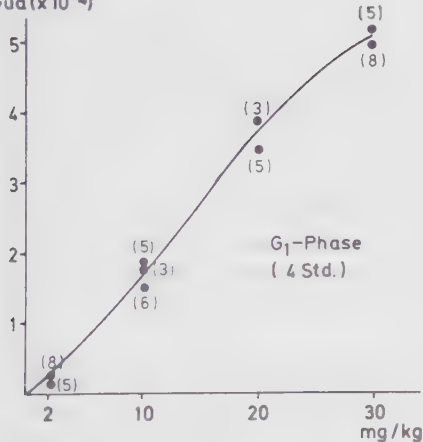
G₁ = 4 Std. nach unilateraler Nephrektomie

S = 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie

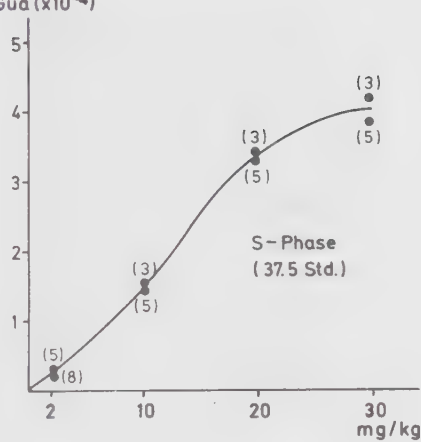
Abb. 10: 7-Methyl-Guanin in der Rattennieren-DNA nach Injektion von ^{14}C DMN in verschiedener Dosis 4 bzw. 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie. Die angegebenen Zahlen entsprechen der Anzahl der vereinigten Nieren (= Tierzahl)

Abb. 11: O^6 -Methyl-Guanin in der Rattennieren-DNA nach Injektion von ^{14}C DMN in verschiedener Dosis 4 bzw. 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie. Die angegebenen Zahlen entsprechen der Anzahl der vereinigten Nieren (= Tierzahl)

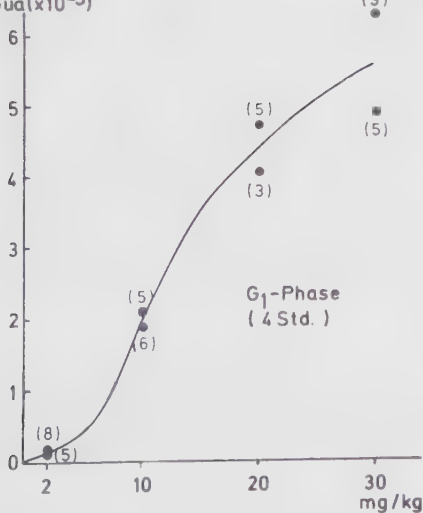
$\frac{7 \text{ MeGua}}{\text{Gua}} (\times 10^{-4})$



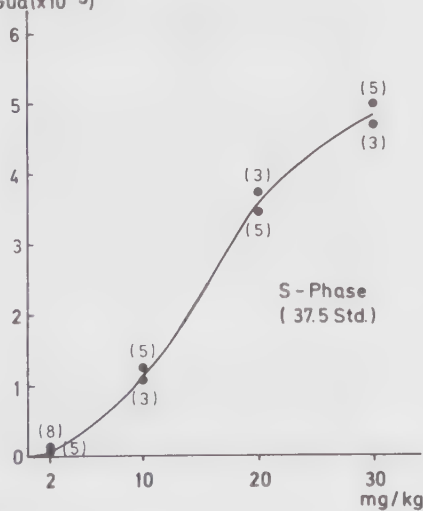
$\frac{7 \text{ MeGua}}{\text{Gua}} (\times 10^{-4})$



$\frac{0^6 \text{ MeGua}}{\text{Gua}} (\times 10^{-5})$



$\frac{0^6 \text{ MeGua}}{\text{Gua}} (\times 10^{-5})$



den Versuchsansatz ist jedoch keine direkte Aussage möglich, in welchem Maß ein toxischer Zellschaden mit einem geringen Nachweis an Methylierungsprodukten korreliert.

Der O^6 meGua / 7 meGua-Quotient (Abb. 12) spiegelt die Summe der an diesen beiden Positionen abgelaufenen Alkylierungs- und Reparaturprozessen bis zur 8. Std. nach DMN-Applikation wider. Insbesondere bei der Dosis von 10 mg/kg liegt der Quotient in der S-Phase signifikant niedriger als in G_1 . Im Bereich dieser Dosis ermöglicht die erhöhte Methyltransferase-Aktivität der regenerierenden Rattenniere eine im Vergleich zur G_1 -Phase effektivere Reparatur des potentiell promutagenen O^6 meGua. Bei höheren Dosen ist die Reparaturkapazität offensichtlich überschritten, der O^6 meGua / 7 meGua Quotient liegt für die G_1 - und die S-Phase in der gleichen Größenordnung.

Im Gegensatz zu O^6 meGua scheint die Elimination von 3 meAd nicht erschöpfbar zu sein, da der 3 meAd / 7 meGua Quotient (Tab. 5) sowohl in der G_1 - als auch in der S-Phase bei steigender DMN-Dosis nicht zunimmt.

3.5 Zusatzversuch: der 3H -Thymidin-Markierungsindex zum Zeitpunkt der DNA Isolierung

Tab. 6 und 7 zeigen den Markierungs- bzw. Mitoseindex von jeweils zwei Versuchstieren je Dosis für das stratum labyrinthicum. Die Tiere wurden zum Zeitpunkt der DNA-Isolierung, d.h. 8 Std. nach DMN-Applikation getötet. Vier Versuchstiere mußten wegen einer fehlerhaften Injektion von 3H -Thymidin ausgeschieden werden.

Insbesondere in der G_1 -Phase (12 Std. p.Op.) sind Mitosen sehr selten (0 - 1 %). Dies steht im Einklang mit Angaben anderer Autoren (Noltenius et al. 1965) über die proliferative Aktivität der ruhenden Niere.

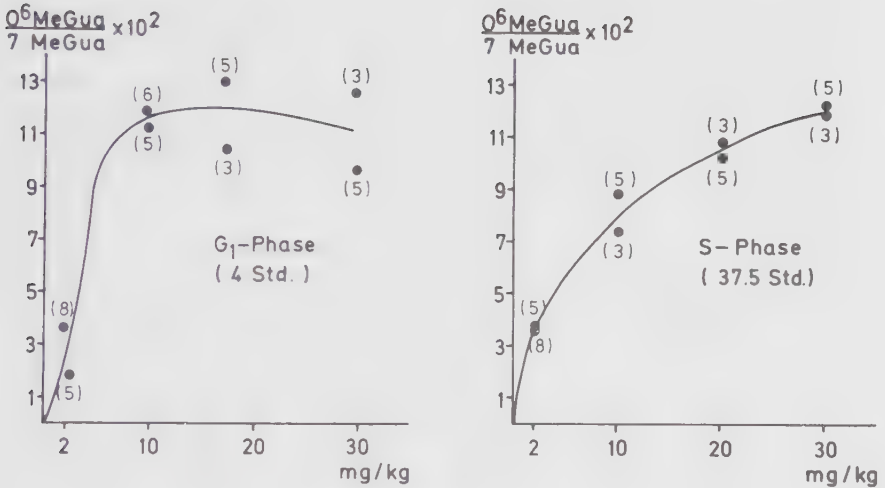


Abb. 12: O⁶-Methyl-Guanin / 7-Methyl-Guanin-Quotient in der Rattenleber-DNA nach Injektion von ¹⁴C DMN in verschiedener Dosis 4 bzw. 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie. Die angegebenen Zahlen entsprechen der Anzahl der vereinigten Nieren (= Tierzahl)

In der S-Phase (Abb. 13) nimmt der Markierungsindex mit steigen- der DMN-Dosis ab. Dies ist auf die toxische Wirkung von DMN zu- rückzuführen, die sich in einer initialen Wachstumsdepression (Rabes 1979) äußert. Zu bedenken ist ferner, daß das Prolifera- tionsmaximum 45,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie bereits überschritten ist (Heine et al. 1971), so daß auch bei nicht- toxischen Dosen nur mit einem relativ niedrigen Markierungsindex zu rechnen ist. Obwohl mit der kleinen Tierzahl keine genauen Aussagen möglich sind, deutet sich an, daß die Proliferation der Tubulusepithelien in der S-Phase bei niedrigen Dosen höher liegt.

Dosis DMN (mg/kg)	Markierungsindex		Mitoseindex	
	Tier 1	Tier 2	Tier 1	Tier 2
2	0,19	0,49	0	0,1
10	0,68	-	0	0
20	0,59	-	0,1	0,1
30	-	0,19	0,1	0

Tab. 6: Markierungs- und Mitoseindex für das stratum labyrin-
thicum 8 Std. nach DMN-Applikation in der G₁-Phase

Dosis DMN (mg/kg)	Markierungsindex		Mitoseindex	
	Tier 1	Tier 2	Tier 1	Tier 2
2	-	3,47	0,78	1,03
10	2,39	1,26	0,38	0,87
20	1,35	1,52	0,48	0,67
30	1,66	0,68	0,39	0,19

Tab. 7: Markierungs- und Mitoseindex für das stratum labyrin-
thicum 8 Std. nach DMN-Applikation in der S-Phase

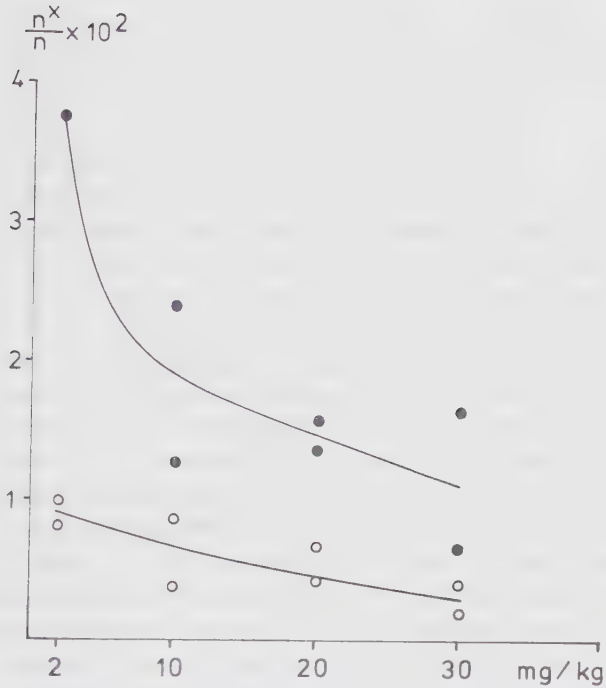


Abb. 13: ^3H -Thymidin-Markierungs- sowie Mitoseindex der Tubulusepithelien im stratum labyrinthicum der Niere 8 Std. nach DMN-Applikation verschiedener Dosen in der S-Phase (37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie). Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier, bei dem 1000 Zellen zur Berechnung des Markierungsindex ausgezählt wurden.

n^x = ^3H -TdR-markierte Zellen ● = Markierungsindex
 n = Gesamtzahl der Zellen ○ = Mitoseindex

4. DISKUSSION

=====

DMN ist in Abhängigkeit vom Proliferationszustand eines Organes, der Art der Applikation und der Dosis ein potentes Leber- und Nierencarcinogen (Magee u. Barnes 1962, Murphy et al. 1966, Hard u. Butler 1970/a, McLean u. Magee 1970, Montesano et al. 1974, Fridman-Manduzio 1977, Rabes 1979, Rabes et al. 1982/b).

Es gilt als gesichert, daß das Carcinogen seine Wirkung durch Metabolisierung zu einem elektrophilen Carbonium-Ion entfaltet, das mit einer Vielzahl von zellulären Makromolekülen reagiert. Die Methylierung der DNA an verschiedenen nucleophilen Zentren (Craddock 1973, Singer 1981) ist offensichtlich eine kritische Determinante im Rahmen der malignen Transformation. Insbesondere die Methylierung der O⁶-Position des Guanin scheint eine promutagene Basenalteration zu sein, die möglicherweise während der DNA-Synthese zu einer falschen Basenpaarung und somit zu Fehlern in der genetischen Information (Gerchmann u. Ludlum 1973, Abbott u. Saffhill 1979) führt. Die Fähigkeit von Zellen, O⁶ meGua von der DNA zu eliminieren, korreliert offensichtlich negativ mit der Wahrscheinlichkeit der Tumorentstehung (Goth u. Rajewsky 1974, Nicoll et al. 1975, Pegg 1977/a). Neben der Höhe und der Persistenz von O⁶ meGua ist die Position von Target-Zellpopulationen im Rahmen des Zellzyklus von entscheidender Bedeutung (Craddock 1973, Fridman-Manduzio 1977, Rabes et al. 1979/b, Rabes et al. 1983).

Im Gegensatz zur HU-synchronisierten Rattenleber nach partieller Hepatektomie (Rabes 1979) ist bei den vorliegenden Untersuchungen an der Rattenniere ein relativ hoher Einbau von radioaktiv markierten Kohlenstoffatomen während der G₁-Phase in Guanin und Adenin nachweisbar (Abb. 2, 4, 6, 8). Die Ursache ist darin zu sehen, daß 4 Std. nach unilateraler Nephrektomie die kompensato-

rische Hyperplasie noch nicht begonnen hat, eine basale Proliferation von im Mittel etwa 0,45 % (Tab. 6) jedoch nachweisbar ist. Der Einbau von ^{14}C aus dem C-1-Pool in Adenin und Guanin in der S-Phase (Abb. 3, 5, 7, 9) weist auf die erhöhte proliferative Aktivität der Niere hin.

Ebenso wie in der Leber (Craddock 1973, Pegg 1977/b) erfolgt die N7-Guanin Methylierung der Niere nahezu linear zur Dosis (Tab. 5, Abb. 10). Das Ausmaß der Methylierung kann als ein Maß für die Metabolisierung des Carcinogens in das methylierende Carbo-nium-Ion gelten (Swann u. Mc Lean 1971). Dabei ist zu berücksichtigen, daß in der Niere die Metabolisierungsrate um das acht- bis zehnfache niedriger liegt als in der Leber (Swann u. Magee 1968). Somit ist die Alkylierung der DNA auch etwa um den Faktor 10 niedriger als in der Leber (Pegg u. Hui 1978).

Bei niedrigen Dosen liegen die Werte für 7 meGua in G_1 - und der S-Phase in der gleichen Größenordnung. Bei den Dosen von 20 und 30 mg/kg, die im Bereich der LD_{50} von DMN liegen (Magee u. Barnes 1967), ist die Methylierung in der S-Phase etwas geringer. Dies steht möglicherweise mit einer erhöhten Sensibilität DNA-synthetisierender Zellen für die toxische Wirkung von DMN in Zusammenhang.

An der Leber wurden bei Dosen zwischen 20 und 30 mg/kg DMN zentrilobuläre Nekrosen nachgewiesen (Magee et al. 1975). Es ist nicht auszuschließen, daß es nach unilateraler Nephrektomie aufgrund des höheren Angebots an Carcinogen für die verbleibende Niere zu Zellschädigungen kommt, die im Verlauf der Nekrobiose zu einem Verlust von DNA und damit auch methylierter Basen führen. Eine mit steigender Dosis zunehmende Wachstumsdepression kann als Hinweis für die toxische Wirkung gewertet werden (Tab. 7, Abb. 13). Darüber hinaus kann eine relative Verdünnung der Methylierungsprodukte durch die weiterlaufende DNA-Synthese Ursache der relativ niedrigen molaren Fraktion von 7 meGua in

der S-Phase sein. Dafür spricht auch der erhöhte Einbau von ^{14}C aus dem markierten C-1-Pool in Adenin und Guanin (Abb. 3, 5, 7, 9). Zu erwägen ist schließlich auch eine möglicherweise in der S-Phase gesteigerte enzymatische Reparatur von 7 meGua, obwohl hierfür in der Literatur keine Angaben vorliegen.

Bei Untersuchungen über die Eliminationskinetik von 7 meGua, über die aus den vorliegenden Untersuchungen keine Aussagen gemacht werden können, konnten Nicoll et al. (1975) zeigen, daß 7 meGua bei Dosen von 2,5 bzw. 20 mg/kg DMN sowohl in der Leber als auch in der Niere mit einer Halbwertszeit von 60 Std. abgebaut wird. Dieser Verlust von 7 meGua aus der DNA in vivo geht etwas schneller vonstatten, als dies der chemischen Depurinierung bei neutralem pH entsprechen würde (Margison u. Pegg 1981), so daß ein enzymatischer Excisionsmechanismus wahrscheinlich ist. Auch an der synchronisierten Rattenleber (Rabes et al. 1982/b) gibt es Hinweise, daß 7 meGua bei niedrigen Dosen von DMN sowohl in der G_1 - als auch in der S-Phase relativ langsam enzymatisch eliminiert wird.

In Leberextrakten von Ratten konnte eine DNA-Glykosylase für 7 meGua bereits nachgewiesen werden (Margison u. Pegg 1981, Cathcart u. Goldthwait 1981). Es wäre von Interesse, auch an Rattennierenextrakten eine mögliche Aktivität dieser Glykosylase zu untersuchen.

Für das in wesentlich geringerer Menge gebildete 3 meAd ist bei den vorliegenden Versuch wegen der niedrigen Ausbeute (20 - 63 cpm) bei den jeweiligen Dosen nur begrenzt eine Aussage möglich (Tab. 5). Der nahezu gleichbleibende 3 meAd / 7 meGua Quotient bei steigender Dosis in der G_1 -Phase spricht dafür, daß die Zellen der Niere über einen auch bei höheren Dosen nicht erschöpfbaren Reparaturmechanismus verfügen. Dies würde Befunden an der Rattenleber entsprechen. Eine in der S-Phase möglicherweise erhöhte Reparaturkapazität für 3 meAd (Rabes et al. 1982/b) kann

anhand der vorliegenden molaren Mengen nicht bestätigt werden, erscheint aber bei höherer Ausbeute an 3 meAd denkbar.

In vitro wurde bisher eine DNA-Glykosylase-Aktivität für 3 meAd an menschlichen Lymphoblasten (Brent 1979), Extrakten von *Micrococcus luteus* (Shackleton et al. 1979) und in nukleären und cytoplasmatischen Extrakten der Rattenleber nachgewiesen (Cathcart u. Goldthwaith 1981). Die bisherigen Befunde sprechen dafür, daß 3 meAd relativ schnell mit einer Halbwertszeit von etwa 3 Std. repariert wird (Margison u. O'Connor 1973). Da im vorliegenden Versuch die DNA 8 Std. nach DMN-Applikation isoliert wurde, kann nur noch ein Bruchteil der ursprünglich vorhandenen 3 meAd Menge nachweisbar sein.

Im Gegensatz zu 7 meGua führt O^6 meGua zu falscher Basenpaarung in der DNA und gilt daher als potentiell promutagene Basenalteration (Loveless 1969, Gerchmann u. Ludlum 1973).

Die molaren Mengen des O^6 meGua entsprechen für alle Dosen etwa 10 % der für 7 meGua gefundenen Werte. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen an der regenerierenden Rattenleber (Rabes 1979, Rabes et al. 1982/b) sowie an der intakten Niere (Nicoll et al. 1975). Bei der Dosis von 2 mg/kg ergeben sich keine signifikanten Unterschiede für O^6 meGua zwischen der G_1 - und S-Phase. Im Gegensatz dazu konnte in der regenerierenden synchronisierten Rattenleber bei etwas höheren Dosen (1,43 und 4 mg/kg) bei Exposition in der S-Phase ein erniedrigter O^6 meGua Gehalt nachgewiesen werden (Rabes et al. 1982/b). Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse ist in der relativ niedrigen Ausbeute an cpm nach 2 mg/kg DMN zu sehen. Aufgrund der Streuung der Werte im Bereich von O^6 meGua ist keine sichere Aussage über zellzyklus-spezifische Unterschiede möglich.

Die Niere verfügt ebenso wie die Leber über eine Methyltransferase für O^6 meGua (Pegg 1977/a). Die Methylgruppe des O^6 meGua

wird auf eine Cystein-Rest eines Proteins transferiert, wodurch Guanin in der DNA regeneriert wird. Es besteht eine stöchiometrische Beziehung zwischen der S-methyl-Cystein-Gruppe dieses Enzyms, der Eliminierung von O^6 meGua aus der DNA und der Regeneration von dealkyliertem Guanin in der DNA (Pegg u. Wiest 1983). Es gibt Hinweise dafür, daß das Enzym nur einmalig arbeitet und nicht regeneriert wird (Bogden 1981, Lindahl 1982).

Nach unilateraler Nephrektomie steigt die Aktivität der Methyltransferase um das 2,5fache an. Das Maximum der Enzymaktivität ist erst drei Tage nach unilateraler Nephrektomie nachweisbar, somit nach dem DNA-Synthesemaximum (Pegg u. Wiest 1983). Aber auch 45,5 Std. post operationem, dem Zeitpunkt der DNA-Isolierung in der S-Phase beim vorliegenden Versuch, ist die Methyltransferase-Aktivität bereits ernöt.

Der erniedrigte O^6 meGua / 7 meGua Quotient bei der Dosis von 10 mg/kg DMN scheint diese erhöhte Reparaturkapazität proliferierender Nierenzellen zu bestätigen. Da diese Dosis noch nicht im toxischen Bereich von DMN liegt, kann man einen unspezifischen Verlust methylierter Basen durch DNA-Verluste mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen.

Bei 20 und 30 mg/kg sind dagegen keine zellzyklusspezifischen Unterschiede nachweisbar. Der O^6 meGua / 7 meGua Quotient liegt in der gleichen Größenordnung. Offensichtlich ist die Kapazität der Methyltransferase bei diesen Dosen unabhängig von Zellzyklus erschöpft. Dies konnte bereits für die ruhende Rattenleber und Niere gezeigt werden (Nicoll et al. 1975, Pegg u. Hui 1978, Stumpf et al. 1979). Neben dem Verbrauch der Enzym-Proteine bei hohen Dosen ist aber auch ein Verlust der Enzymaktivität durch direkte Methylierung der Transferase zu diskutieren (Pegg et al. 1983). S-Methyl-Cystein wurde als mögliches Produkt der Reaktion alkylierender Agentien mit Proteinen beschrieben (Turberville u. Craddock 1971). Somit ist bei hohen Dosen der O^6 meGua-Gehalt

zum einen abhängig von der erschöpfbaren Reparaturkapazität der proliferierenden Zellen, zum anderen von der Inaktivierung der Methyltransferase durch DMN.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist insgesamt eine Aussage über eine möglicherweise erhöhte Reparaturkapazität DNA-synthesisierender Nierenzellen nur mit Einschränkungen möglich. Der erniedrigte O^6 meGua / 7 meGua-Quotient bei der Dosis von 10 mg/kg DMN könnte ein Hinweis darauf sein, daß die regenerierende Niere ebenso wie die regenerierende Rattenleber (Pegg et al. 1981, Rabes et al., 1982/b) über eine in der S-Phase erhöhte Methyltransferase-Aktivität verfügt, die ab einer noch unbekannten Schwellendosis nicht mehr ausreicht, O^6 meGua vor der folgenden Zellreplikation zu eliminieren. Diese Schwellendosis könnte bei der regenerierenden Rattenniere zwischen 10 und 20 mg/kg DMN liegen.

Bei höheren Dosen ist folglich mit einer verlängerten Persistenz des promutagenen Alkylierungsprodukts zu rechnen. Dies ist für eine Dosis von 20 mg/kg von Nicoll et al. (1975) beschrieben worden, die nach einem initialen Abfall von 30 % einen über 50 Std. erhöhten O^6 meGua Spiegel nachwiesen. Nach unilateraler Nephrektomie dauert die Elimination aufgrund des höheren Substratangebotes bei hohen Dosen möglicherweise noch länger.

Dem proliferativen Status von Target-Zellpopulationen kommt beim vorliegenden Versuchsansatz in zweifacher Hinsicht Bedeutung zu: Zum einen wird DMN zum Zeitpunkt der maximalen DNA-Synthese appliziert, so daß den Zellen für eine Reparatur des O^6 meGua vor der DNA-Replikation wenig Zeit bleibt. Zum anderen kommt es bei hohen Dosen von DMN nach einer initialen Suppression der DNA-Synthese zu einer reaktiven Proliferation, wie es Steward und Magee (1971) für 40 mg DMN bei Ratten mit proteinfreier Diät zeigen konnten. Das Maximum der reaktiven Proliferation liegt bei drei Tagen nach DMN-Applikation, zu dem Zeitpunkt, wo mögli-

cherweise noch persistierend hohe O^6 meGua-Spiegel vorhanden sind. In Anlehnung an das Zweistufenmodell bei Hauttumoren (Berenblum 1975), könnte die DNA-Replikation einen promovierenden Charakter haben. Nach einer initiierenden Dosis, die bei hohen Dosen zur Erschöpfung der Reparaturkapazität führt, könnte die reaktive Proliferation zusätzlich das Risiko der malignen Transformation erhöhen. Untersuchungen über die Eliminationskinetik von O^6 meGua bei unilateral nephrektomierten Ratten für verschiedene Dosen wären in diesem Zusammenhang von großem Interesse.

Bei allen Versuchen, die Bildung und Persistenz von O^6 meGua und den proliferativen Status der Rattenniere nach unilateraler Nephrektomie in ihrer Wertigkeit für die chemische Carcinogenese zu beurteilen, muß man die ausgeprägte Heterogenität der Zellzykluskompartimente in der Rattenniere im Gegensatz zur synchronisierten Rattenleber (Rabes et al. 1977) berücksichtigen.

Nach unilateraler Nephrektomie sind nach 38 Std. nur etwa 6 % der Tubulusepithelien (Heine u. Stöcker 1971) simultan in der S-Phase. Nach partieller Hepatektomie und Hydroxyharnstoff-Infusion ist das S-Kompartiment der Hepatozyten in der Leber weitgehend einheitlich mit einem Anteil von 80 % DNA-synthetisierender Zellen (Rabes et al. 1977). Für zellzyklusspezifische Untersuchungen über das Alkylierungsmuster der Niere ist der relativ niedrige Synchronisationsgrad von Zellen in der S-Phase zusätzlich ein limitierender Faktor. Bei hohen Dosen wird die DNA-Synthese zusätzlich supprimiert (Tab. 7, Abb. 13), so daß 8 Std. nach DMN-Applikation die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen sowohl in der Proliferationsrate als auch im Alkylierungsmuster gering sind.

In bezug auf die Höhe und Persistenz des potentiell promutagenen O^6 meGua in ihrer Bedeutung für die Induktion von Nierentumoren muß schließlich einschränkend gesagt werden, daß die gemessenen

molaren Mengen die durchschnittliche Alkylierung, bezogen auf das gesamte Organ, widerspiegeln. Es ist nicht auszuschließen, daß das Alkylierungsmuster in verschiedenen Abschnitten der Tubulusepithelien sowie in den interstitiellen Zellen stark variiert.

An der Leber konnte nach chronischer Applikation von 1,2-Dimethylhydrazin gezeigt werden, daß nicht-parenchymale Zellen in einem deutlich höheren Maß O^6 meGua akkumulierten als Hepatozyten (Swenberg 1982). Die Inzidenz an Angiosarkomen betrug 80 %, wogegen hepatozelluläre Carcinome in 40 % der Fälle auftraten. Es wäre daher von großem Interesse, das Alkylierungsmuster nach DMN-Applikation im proximalen Tubulusepithel sowie in den corticalen Fibrozyten zu analysieren, da diese Zellpopulationen möglicherweise die Ursprungszellen für epitheliale bzw. mesenchymale Tumoren der Niere sind.

Im zweiten Teil der Arbeit soll nun für gleiche Expositionsbedingungen (Injektion von DMN 4 oder 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie) untersucht werden, ob nach 10, 20 oder 30 mg/kg DMN die Nierentumorinzidenz für die beiden untersuchten Zellzyklusphasen G_1 und S differiert.

Es wird eine Analyse versucht, ob für die angegebenen Dosen eine Korrelation zwischen der Höhe des O^6 meGua, der Position der Target-Zellen im Zellzyklus und der Tumorzinzidenz besteht.

II. MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG DER ZELLPROLIFERATION FÜR DIE TUMORINDUKTION AN DER RUHENDEN UND PROLIFERIERENDEN RATTENNIERE DURCH DIMETHYLNITROSAMIN (DMN)

1. EINLEITUNG

=====

1.1 Einteilung der DMN-induzierten Nierentumoren

In einer Vielzahl von Veröffentlichungen wird über die Induktion von Nierentumoren durch DMN berichtet (Zak et al. 1960, Magee u. Barnes 1962, Thomas u. Schmähl 1964, Terracini u. Magee 1964, Murphy et al. 1966, Hadjiolov 1968, Riopelle u. Jasmin 1969, Mc Lean u. Magee 1970, Fridmann-Manduzio et al. 1977, Hard 1979). Trotz umfangreicher histologischer, enzymhistochemischer, elektronenmikroskopischer und autoradiographischer Untersuchungen (Jasmin u. Riopelle 1968, Bannasch u. Schacht 1968, Hard u. Butler 1970/a, b, Hard u. Butler 1971/a, b, c, Hard u. Shaw 1974, Hard 1975) bleibt die Einteilung und Histogenese dieser Tumoren unklar.

DMN induziert in der Rattenniere zwei Formen von Nierentumoren: Zum einen mesenchymale Tumoren, deren Ursprung in periglomerulären Fibroblasten gesehen wird (Hard u. Butler 1970/a, b, 1971/b), zum anderen epitheliale Tumoren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit aus alterierten proximalen Tubulusepithelien hervorgehen (Hard 1970/a, Hard u. Butler 1971/c).

Der proliferative Status sowie der Differenzierungsgrad dieser Target-Zellpopulationen scheint einen wesentlichen Einfluß auf die Expression der jeweiligen Tumorart zu haben: Terracini u. Magee (1964) erzeugten an neugeborenen, einen Tag alten Wistar Ratten ausschließlich mesenchymale Tumoren nach DMN-Applikation, wogegen Murphy et al. (1966) nach 18 mg/kg DMN ausschließlich corticale epitheliale Tumoren bei fünf Monate alten Ratten fanden.

Hard (1979) bestätigte diese Befunde in einer detaillierten Untersuchung an mehr als 300 Ratten, die fünf Tage vor Applikation von 30 mg/kg DMN eine proteinfreie kohlenhydratreiche Diät erhielten. Mesenchymale Tumoren traten mit einer sehr hohen Inzidenz bei neonatalen und einen Monat alten Tieren auf, bei fünf Monate alten Ratten sank die Tumorrare auf Null. Im Gegensatz dazu erreichte die Sensibilität der Niere für epitheliale Tumoren bei drei Monate alten Tieren ein Maximum. Eine mögliche Erklärung dieser Befunde - zumindest für die mesenchymalen Tumoren bei sehr jungen Ratten - ist nach Hard (1979) in der Persistenz von embryonalen mesenchymalen Stammzellen zu sehen, die nach fünf Monaten einen Differenzierungsgrad erreicht haben, der sie möglicherweise gegenüber einer DMN-induzierten Alteration ihres Genoms refraktär werden läßt.

Hinweise für die Bedeutung der Proliferation für die Induktion von Nierentumoren ergeben sich aus Befunden von Ito et al. (1969). 150 bis 180 g schwere Wistar Ratten erhielten 500 mg DMN über 14 Tage in ihrem Futter entweder vor oder nach einer unilateralen Nephrektomie. In der Tiergruppe, die vor DMN-Applikation unilateral nephrektomiert wurde, betrug die Tumorzinzidenz 82,7 %, wobei epitheliale Tumoren in 16,3 % und mesenchymale in 86,6 % der Fälle auftraten. DMN-Applikation nach unilateraler Nephrektomie führte hingegen ausschließlich zu mesenchymalen Tumoren bei nur 40 % der Tiere.

Untersuchungen, die den proliferativen Status von Target-Zellpopulationen in der Niere bei der Induktion von Tumoren durch einmalige Applikation von DMN berücksichtigen, liegen derzeit nicht vor.

1.2 Fragestellung und Skizzierung des Versuchsmodells

Wie im ersten Teil der Arbeit beschrieben (siehe 1.4), wurde durch eine unilaterale Nephrektomie eine Proliferationswelle in der verbleibenden Niere induziert.

Es wurden zwei Gruppen von Tieren gebildet: Die erste Gruppe bekam DMN in der G₁-Phase (4 Std. p.Op.) in einer einmaligen Dosis intraperitoneal injiziert, die zweite Gruppe erhielt das Carcinogen zum Zeitpunkt der maximalen DNA-Synthese (37,5 Std. p.Op.). Alle Tiere wurden um 19 Uhr $\pm$ 1.5 Std. operiert. Analog zum biochemischen Teil der Arbeit wurde Gruppen von Tieren DMN in einer Dosis von 10, 20 oder 30 mg/kg appliziert.

Ziel der Untersuchungen war, für verschiedene Dosen von DMN mögliche zellzyklusspezifische Unterschiede in bezug auf die Tumorzinidenz nach einem Beobachtungszeitraum von insgesamt zwei Jahren zu bestimmen. Da ferner Beziehungen zwischen dem Zeitpunkt der DMN-Applikation nach unilateraler Nephrektomie auf der einen Seite und Tumortyp und Wachstumsverhalten auf der anderen Seite denkbar sind, wurde einem Teil der Tiere vor der Tötung Tritiummarkiertes Thymidin intraperitoneal injiziert, um die proliferative Aktivität der induzierten Tumoren bestimmen zu können.

2. MATERIAL UND METHODE

=====

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchung wurde an 256 männlichen Wistar AF/Han Ratten durchgeführt. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von 119 g vor der unilateralen Nephrektomie. Sie wurden bei einer Altromin-Standarddiät und Trinkwasser ad libitum in Makrolon Käfigen zu je fünf Tieren bei 21 °C Raumtemperatur und 60 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Nach Ablauf eines Jahres erhielten sämtliche Tiere Einzelkäfige.

2.2 Operatives Vorgehen und DMN-Applikation

Die unilaterale Nephrektomie erfolgte um 19 Uhr $\pm$ 1,5 Std. in gleicher Weise wie im ersten Teil der Arbeit beschrieben (siehe 2.2). Nach 4 bzw. 37,5 Std. erfolgte die intraperitoneale Injektion des in 0,9 % NaCl gelösten DMN (E. Merck AG, Darmstadt) in Form einer einmaligen Dosis von 10, 20 oder 30 mg/kg KG. Die Injektionszeitpunkte wurden für jeweils fünf Tiere gemittelt, das injizierte Volumen betrug 0,75 ml/200 g KG.

2.3 Einteilung der Versuchstiere

Die Einteilung nach DMN-Dosis, Zeitpunkt der DMN-Applikation und Anzahl der Versuchstiere ist aus Tab. 8 ersichtlich. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden lediglich unilateral nephrektomiert, ohne eine DMN-Injektion zu erhalten.

Dosis DMN (mg/kg)	G ₁ -Phase 4 Std.	S-Phase 37,5 Std.
10	32	31
20	30	31
30	41 (33 ^a)	57 (33 ^a)
Kontrolltiere	33	

Tab. 8: Einteilung der unilateral nephrektomierten Versuchstiere nach Dosis DMN, Injektionszeitpunkt und Anzahl
^a = Zahl der in den Versuch aufgenommenen Tiere

Da nach 30 mg/kg DMN die Letalität der Ratten aufgrund der akut toxischen Wirkung von DMN hoch war (siehe 3.2), war eine größere Zahl von Versuchstieren nötig, um in den verschiedenen Versuchsgruppen die angestrebte Zahl von 30 Tieren zu erreichen. In den Versuch wurden nur Tiere aufgenommen, die die ersten vier Tage nach DMN-Injektion überlebten. Dies waren für beide Gruppen, die 30 mg/kg erhielten, 33 Tiere.

2.4 Gewichtskontrolle

Jeweils zehn Tiere der Tiergruppen, die 10 bzw. 30 mg/kg DMN erhielten, wurden bis zum neunten postoperativen Tag täglich um 9.30 Uhr gewogen. Danach erfolgte die Gewichtskontrolle in wöchentlichen Abständen bis zum 37. Tag nach unilateraler Nephrektomie.

2.5 Tötungsintervalle, Sektion der Versuchstiere und histologische Aufarbeitung entnommener Organe

Die Tiere wurden täglich kontrolliert. Die Überlebenszeit wurde vom Zeitpunkt der DMN-Applikation an registriert.

Nach Ablauf eines Jahres wurden durchschnittlich neun Versuchstiere je Gruppe getötet, nach 20 Monaten und 24 Monaten jeweils im Mittel sechs Tiere. Aus Tab. 9 ist die Gesamtzahl der nach 12, 20 und 24 Monaten getöteten Tiere je Versuchsgruppe ersichtlich.

Dosis DMN (mg/kg)	G ₁ -Phase 4 Std.	S-Phase 37,5 Std.
10	24/32	23/31
20	18/30	20/31
30	25/33	25/33
Kontrollen	21/33	

Tab. 9: Zahl der nach 12, 20 und 24 Monaten getöteten Tiere / Gesamtzahl der Tiere je Versuchsgruppe

Sämtliche getöteten und verstorbenen Tiere wurden seziert. Die makroskopische Beurteilung umfaßte die äußeren Organe sowie die Thorakal- und Abdominalorgane. Von jedem Tier wurde ein Sektionsprotokoll erstellt, in dem die beobachteten Organveränderungen beschrieben wurden. Routinemäßig wurden Niere, Leber und Lunge entnommen, ferner sämtliche Organe, die makroskopisch pathologische Veränderungen zeigten. Nach Fixierung in 10 %igem Formol und Einbettung in Paraffin wurden histologische Schnitte

von 5 μm Dicke angefertigt und mit Hämatoxylin Eosin gefärbt. In einigen Fällen ergänzte eine Elastica van Gieson Färbung sowie eine Silberfärbung die weitere mikroskopische Abklärung.

Bei den nach zwölf Monaten getöteten Versuchstieren wurden von den entnommenen Nieren teilweise Stufenschnitte angefertigt. Neben der Routine-HE-Färbung wurde eine PAS-Färbung sowie eine Glykogen-Färbung nach Best zur Abklärung möglicher histochemischer Hinweise auf die Transformation von Tubuluszellen durchgeführt. Mindestens drei Tiere je Gruppe erhielten ferner eine einmalige intraperitoneale Injektion von Tritium-markiertem Thymidin (spezifische Aktivität 5 Ci/mMol, Radiochemical Centre Amersham) in einer Konzentration von 200 $\mu\text{Ci/ml}$ steriler Kochsalzlösung bei einer Dosis von 0,8 $\mu\text{Ci/g KG}$. Die Injektion erfolgte eine Stunde vor Tötung der Tiere durch Nackenschlag.

Um die proliferative Aktivität möglicher Tumoren bestimmen zu können, erhielten sämtliche Tiere, die nach 20 bzw. 24 Monaten nach DMN-Applikation getötet wurden, ebenfalls eine Injektion mit Tritium-markiertem Thymidin (Herstellung der Autoradiographien siehe 2.8.3, Teil 1).

2.6 Einteilung der Nierentumoren, Größenbestimmung und autoradiographische Auswertung

Der Differenzierungsgrad der Tumoren wurde in Anlehnung an Meister u. Rabes (1973) nach folgender Einstufung vorgenommen:

1. Hochgradig differenzierter Tumor mit tubulärer Struktur
2. Mäßig differenzierter Tumor mit tubulo-trabekulärer Struktur
3. Geringgradig differenzierter Tumor mit trabekulärer bis medullärer Struktur
4. Anaplastischer, undifferenzierter Tumor mit spindelizelligen sarkomähnlichen Bezirken.

Die Größe von Tumorbezirken wurde am HE-gefärbten Präparat durch Messung zweier senkrecht zueinander stehender Durchmesser bestimmt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß diese Meßmethode das reale Volumen der Tumoren nur annäherungsweise widerspiegelt.

Die Auswertung der Autoradiographien erfolgte mit Hilfe eines Rasterokulars bei 400facher Vergrößerung (Okular 10fach, Olimmersions-Objektiv 40fach). In jedem Präparat wurde der Markierungsindex von 1000 Tumorzellen sowie von 1000 Tubuluszellen im stratum labyrinthicum bestimmt. Bei einigen Tumoren mußte der Markierungsindex aufgrund der geringen Größe der Tumoren aus niedrigeren Zellzahlen (Minimum 425 Zellen) bestimmt werden.

2.7 Zusatzversuch: Das Proliferationsverhalten der regenerierenden Rattenniere nach Hydroxyharnstoff-Applikation

In der regenerierenden Rattenleber lassen sich die physiologischerweise partiell synchronisierten Zellzykluskompartimente durch Hydroxyharnstoff in einem hohen Maß synchronisieren. Nach einer 30stündigen HU-Dauerinfusion, die 14 Std. nach partieller Hepatektomie begonnen wird, steigt der Anteil der DNA-synthetisierenden Zellen auf mehr als 80 % (Rabes et al. 1977). Die Wirkung von HU beruht dabei auf einer Inhibition des Übergangs der Hepatozyten von der G_1 - in die S-Phase, die RNA und die Proteinsynthese bleibt jedoch unbeeinflusst. Die Hemmung der DNA-Synthese ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Verarmung des Pools an Desoxyribonukleotiden zurückzuführen, da die Reduktion der Nukleotide durch HU verhindert wird (Theiss u. Fischer 1976). Im Modell der regenerierenden Rattenleber führt eine Carcinogenapplikation zum Zeitpunkt der synchronisierten DNA-Synthese zu einer deutlich erhöhten Tumorzinzidenz (Rabes 1979). Es sollte daher geprüft werden, ob durch HU an der regenerierenden Rattenniere eine ähnliche Synchronie der Zellzykluskompartimente zu erzielen ist.

2.7.1 Versuchstiere

Die Untersuchung wurde an sechs männlichen Wistar AF/Han Ratten mit einem Gewicht von 211 bis 224 g durchgeführt, die zwischen 10 und 11 Uhr vormittags unilateral nephrektomiert wurden.

2.7.2 Hydroxyharnstoff-Dosis und Applikation

Beginnend 22 Std. nach Operation erhielt jedes Tier in vierstündigen Abständen eine intraperitoneale Injektion von 0,5 mg HU/g KG (Hydroxyharnstoff, Fa. Serva, Feinbiochemica, Heidelberg), gelöst in physiologischer Kochsalzlösung. 42 Std. nach unilateraler Nephrektomie erfolgte die letzte Injektion. Wie Rajewsky et al. (1971) am transplantablen BICR/M1R Mamma-Tumor sowie der Leber und der Milz weiblicher Marshall Ratten zeigen konnten, lassen sich durch eine zweimalige Injektion von 0.5 mg HU/g KG im Abstand von fünf Stunden die DNA-synthetisierenden Zellen über einen Zeitraum von zehn Stunden wirksam blockieren. Ausgehend von diesen Befunden sollte im vorliegenden Versuch eine 24stündige HU-Blockade erzielt werden (22. - 46. Std. p.Op.), die den Zeitraum der maximalen Proliferation der regenerierenden Niere umfaßt. Eine HU-Dauerinfusion, die sich am Modell der regenerierenden Leber bewährt hat, wurde nicht gewählt, um mögliche strukturelle Schäden an den Nierentubuli aufgrund des deutlich höheren zugeführten Flüssigkeitsvolumens zu vermeiden.

Um den Ablauf der Proliferation nach der HU-Blockade bestimmen zu können, wurde beginnend von der 46. Std. p.Op. in dreistündigen Abständen jeweils ein Tier getötet. Eine Stunde vor der Tötung der Tiere erfolgte eine einmalige intraperitoneale Injektion von Tritium-markiertem Thymidin (spezifische Aktivität 5 Ci/mMol, Radiochemical Center Amersham) in einer Konzentration von 200 μ Ci/ml steriler Kochsalzlösung bei einer Dosis von 0,8 μ Ci/g KG.

2.7.3 Auswertung der Autoradiographien

Die Auswertung erfolgte in gleicher Weise wie unter 2.6 beschrieben. In jedem Präparat wurden der Markierungsindex und Mitoseindex von jeweils 1000 Zellen im stratum labyrinthicum und im stratum subcorticale bestimmt.

3. ERGEBNISSE

=====

3.1 Gewichtsverlauf unilateral nephrektomierter Ratten nach DMN bei verschiedenen Dosen und Injektionszeitpunkten

Die Abbildungen (14 - 18) zeigen den Gewichtsverlauf unilateral nephrektomierter Ratten nach 10 bzw. 30 mg/kg DMN, wobei die gleiche Dosis entweder 4 Std. oder 37,5 Std. p.Op. injiziert wurde. Die Kontrolltiere wurden lediglich unilateral nephrektomiert, ohne eine DMN-Injektion zu erhalten. Die Abbildungen geben den Mittelwert von jeweils zehn Tieren sowie die Standardabweichung an.

Die Kontrolltiere (Abb. 14) erreichen nach einem leichten Gewichtsabfall während der ersten drei postoperativen Tage zwischen dem dritten und vierten Tag nach unilateraler Nephrektomie ihr Ausgangsgewicht (AG). Am neunten Tag haben die Tiere im Mittel 14,4 g (= 6,4 % des AG) zugenommen. 37 Tage p.Op. beträgt die Gewichtszunahme durchschnittlich 54,3 g (= 22,2 % des AG).

Ratten, denen 10 mg/kg DMN 4 Std. nach unilateraler Nephrektomie injiziert wurde (Abb. 15), zeigen am ersten postoperativen Tag einen Gewichtsverlust von im Mittel 3,33 g (= 1,5 % des AG). Sie erreichen bei steter Gewichtszunahme ihr ursprüngliches Gewicht zwischen dem siebten und achten Tag p.Op.. 37 Tage nach Nephrektomie liegen die Tiere bei einer Gewichtszunahme von durchschnittlich 53,6 g 24,4 % über ihrem Ausgangsgewicht.

Wird DMN in derselben Dosis von 10 mg/kg 37,5 Std. p.Op. appliziert (Abb. 16), beträgt der Gewichtsverlust am dritten postoperativen Tag im Mittel 10,7 g (= 4,8 % des AG). Abgesehen von

einer leichten Abnahme des Gewichts zwischen dem fünften und sechsten Tag p.Op., wird das AG ebenso wie bei den nach 4 Std. injizierten Tieren zwischen dem siebten und achten Tag p.Op. erreicht. 37 Tage nach unilateraler Nephrektomie haben die Tiere durchschnittlich 57,5 g (= 25,6 % des AG) zugenommen.

Betrachtet man den Gewichtsverlauf bei der Dosis von 30 mg/kg DMN nach verschiedenen Injektionszeitpunkten (Abb. 17, 18), so ergeben sich interessante Einzelheiten. 4 Std. nach unilateraler Nephrektomie injiziert, führt DMN zu einem maximalen Gewichtsabfall von im Mittel 20,6 g (= 9,3 % des AG) am zweiten postoperativen Tag. Wird die gleiche Dosis 37,5 Std. p.Op. appliziert, erfolgt ein prolongierter Gewichtsverlust, der sich bis zum sechsten Tag p.Op. erstreckt. Mit durchschnittlich 24,5 g (= 11,1 % des AG) erreicht die Gewichtsreduktion zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum. Beide Versuchsgruppen liegen neun Tage nach Operation unter ihrem ursprünglichen Körpergewicht. Der Gewichtsverlust ist bei der Tiergruppe, die DMN 37,5 Std. p.Op. erhielt, mit durchschnittlich 14,1 g (= 6,4 % des AG) fast doppelt so hoch wie bei den Tieren, die DMN 4 Std. p.Op. erhielten und durchschnittlich nur 7,9 g (= 3,5 % des AG) abnahmen. 37 Tage nach unilateraler Nephrektomie haben sich die Tiere offensichtlich wieder vollständig erholt, die mittlere Gewichtszunahme liegt für die 4 Std. p.Op. injizierten Tiere mit 55,2 g (= 25,0 % des AG) und für die 37,5 Std. p.Op. injizierten Ratten mit 49,1 g (= 22,2 % des AG) in der gleichen Größenordnung wie bei den Kontrolltieren.

3.2 Überlebenszeiten

Aus Tab. 10 ist die Zahl der Tiere je Versuchsgruppe ersichtlich, die innerhalb von 365 bzw. 730 Tagen nach DMN-Injektion spontan verstarben. Ein unmittelbarer Vergleich der verstorbenen Tiere ist nur für das erste Jahr nach DMN-Applikation möglich,

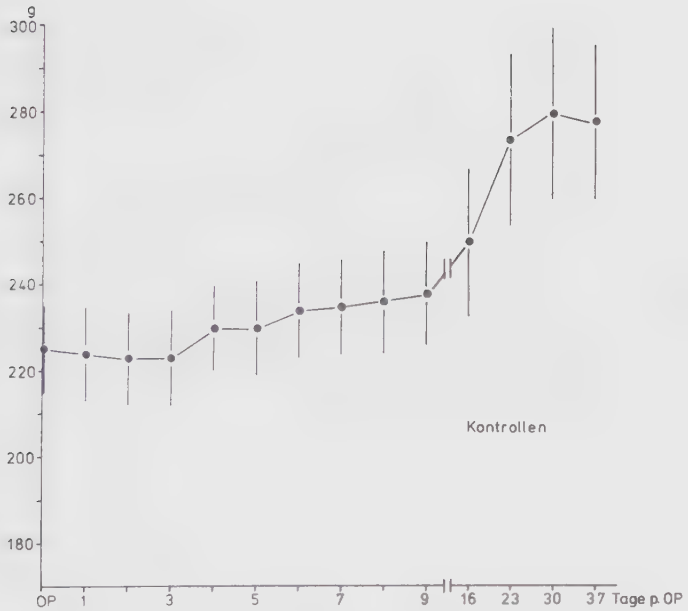


Abb. 14: Gewichtsverlauf unilateral nephrektomierter Ratten bis zum 37. Tag p.Op.
Angegeben sind Mittelwerte von jeweils 10 Tieren sowie die Standardabweichung.

Abb. 15: Gewichtsverlauf unilateral nephrektomierter Ratten nach 10 mg/kg DMN 4 Std. p.Op. bis zum 37. Tag p.Op. Angegeben sind Mittelwerte von jeweils 10 Tieren sowie die Standardabweichung.

Abb. 16: Gewichtsverlauf unilateral nephrektomierter Ratten nach 10 mg/kg DMN 37,5 Std. p.Op. bis zum 37. Tag p.Op. Angegeben sind Mittelwerte von jeweils 10 Tieren sowie die Standardabweichung.

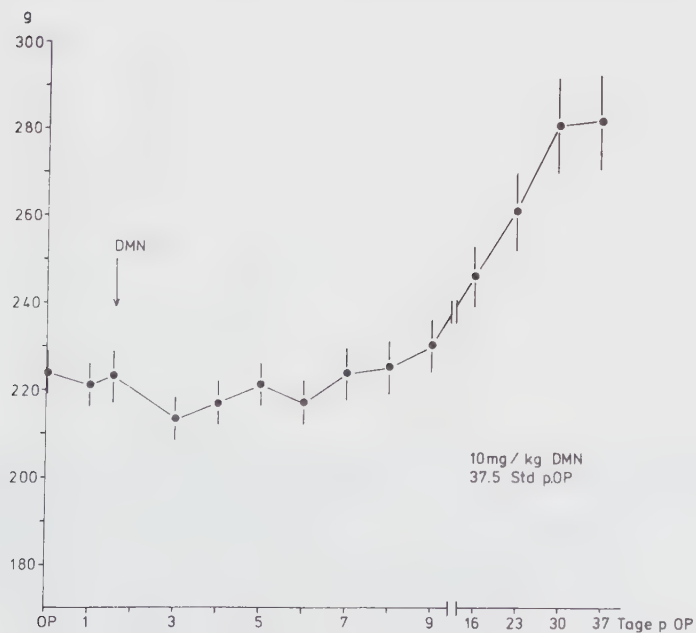
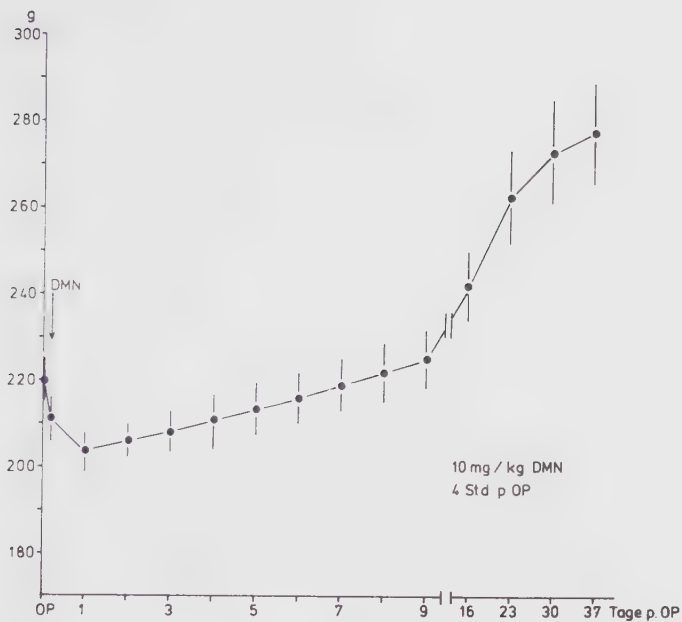
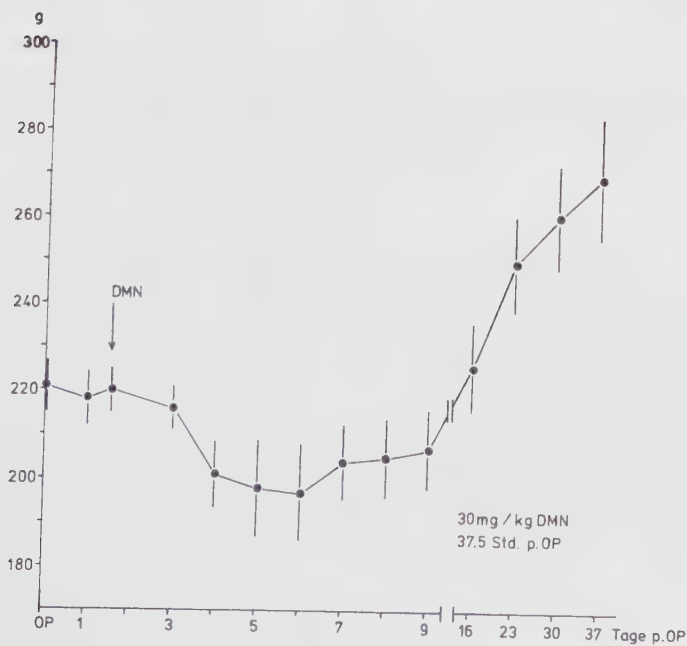
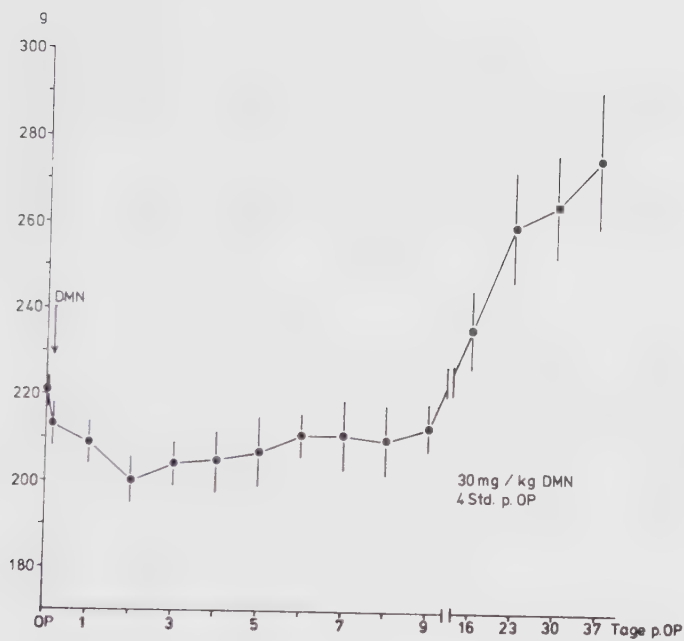


Abb. 17: Gewichtsverlauf unilateral nephrektomierter Ratten nach 30 mg/kg DMN 4 Std. p.Op. bis zum 37. Tag p.Op. Angegeben sind Mittelwerte von jeweils 10 Tieren sowie die Standardabweichung.

Abb. 18: Gewichtsverlauf unilateral nephrektomierter Ratten nach 30 mg/kg DMN 37,5 Std. p.Op. bis zum 37. Tag p.Op. Angegeben sind Mittelwerte von jeweils 10 Tieren sowie die Standardabweichung.



Tage nach DMN Applikation	Kontrollen	10 mg/kg		20 mg/kg		30 mg/kg	
		4 Std.	37,5 Std.	4 Std.	37,5 Std.	4 Std.	37,5 Std.
1 - 100	-	-	-	1	2	10 (8 ^a)	24 ^a
101 - 200	-	-	-	2	2	-	-
201 - 300	2	2	-	3	1	-	-
301 - 365	-	1	2	2	1	-	2
366 - 450	1	1	1	-	-	-	1
451 - 600	4	1	3	2	3	5	3
601 - 730	5	3	2	2	2	1	2
Gesamtzahl ^b	12/33	8/32	8/31	12/30	11/31	16/41	32/57

Tab. 10: Zahl der Tiere je Versuchsgruppe, die innerhalb von 365 bzw. 730 Tagen nach DMN-Injektion in den verschiedenen Versuchsgruppen spontan verstarben

a = Zahl der bis zum vierten Tag nach DMN-Applikation verstorbenen Tiere

b = Zahl der verstorbenen Tiere / Gesamtzahl je Gruppe

da die Gesamtzahl der nach 12, 20 und 24 Monaten getöteten Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen variierte (siehe 2.5). Bei der niedrigen Dosis von 10 mg/kg DMN überlebten für beide Injektionszeitpunkte sämtliche Versuchstiere bis zum 200. Tag. Nach 365 Tagen sind bei Injektion von DMN in der S-Phase 2 von 31 Tieren (= 6,5 %) verstorben, bei Injektion in der G₁-Phase 3 von 32 Tieren (= 9,4 %).

In der Kontrollgruppe verstarben lediglich 2 von 33 Tieren (= 6,1 %), wobei ein Tier vom Deckel des Käfigs erdrückt wurde. Die beiden Tiergruppen, die 20 mg/kg DMN erhielten, nehmen eine Mittelstellung ein; während des ersten Beobachtungsjahres ist weder kurz nach DMN-Applikation, noch zu einem späteren Zeitpunkt eine Häufung der spontanen Todesfälle erkennbar. Die Zahl der verstorbenen Tiere ist bei Injektion 4 Std. p.Op. mit 8 von 30 (= 26,7 %) etwas höher im Vergleich zu 6 von 31 Tieren (= 19,4 %) in der Tiergruppe, die DMN nach 37,5 Std. erhielt.

Für die Dosis von 30 mg/kg DMN ist ein deutlicher Anstieg der Mortalität der Ratten erkennbar, die DMN zum Zeitpunkt der maximalen Regeneration der verbleibenden Niere erhielten. 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie appliziert, führt DMN bei 26 von 57 Tieren (= 45,6 %) im ersten Jahr zum Tode im Gegensatz zu nur 10 von 41 (= 24,4 %) bei Injektion nach 4 Std.

Der Großteil der Tiere verstarb kurz nach DMN-Injektion: Wurde 30 mg/kg DMN 37,5 Std. p.Op. injiziert, verendeten 92,3 % (24 von 26 Tieren) bis zum vierten Tag nach Applikation, bei Injektion 4 Std. p.Op. starben 80 % (8 von 10 Tieren) am dritten und vierten Tag. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Befunden von Magee u. Barnes (1967) sowie Druckrey (1967), wonach bei hohen Dosen DMN die Tiere entweder am zweiten bis vierten Tag nach Applikation des Carcinogens sterben oder sich vollständig erholen.

3.3 Todesursachen

Soweit ausgedehnte Tumoren (siehe 3.4) nicht zum Tode geführt hatten, waren bei einem Großteil der verstorbenen Tiere Bronchopneumonien als Todesursache anzunehmen, die teilweise pseudolobulär entwickelt waren oder zu bronchogenen Abszessen geführt hatten. Daneben wurden häufig Pyelonephritiden in der verbleibenden Niere beobachtet, die bei einigen Tieren möglicherweise im Rahmen einer Sepsis zum Tode führten.

Im Gegensatz dazu fanden sich bei den akut bis zum vierten Tag nach DMN-Applikation verstorbenen Tieren ausgedehnte zentrilobuläre Nekrosen in der Leber. Die dadurch bedingte hämorrhagische Diathese ist möglicherweise Ursache der beobachteten Blutungen in Leber und Lunge.

An der verbleibenden Niere konnten in Übereinstimmung mit Magee u. Barnes (1962) keine akuten zellulären Schäden nachgewiesen werden. Eine leichte hydropische Schwellung der Nierentubuli wurde als Folge des vermehrten Flüssigkeitsangebots an die verbleibende Niere nach unilateraler Nephrektomie gewertet.

3.4 Nierentumorinzidenz in Abhängigkeit von Applikationszeitpunkt von DMN

Tab. 11 gibt eine Übersicht über die Anzahl der Ratten mit Nierentumoren bis zum 730. Tag nach Applikation von DMN in der Dosis von 10, 20 und 30 mg/kg 4 bzw. 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie.

Bei der niedrigen Dosis von 10 mg/kg DMN treten über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Nierentumoren auf. Der einzige Spontantumor an der Niere wurde bei einem Kontrolltier beobach-

Verstorbene bzw. getötete Tiere Kontrollen 10 mg/kg 20 mg/kg 30 mg/kg
 4 Std. 37,5 Std. 4 Std. 37,5 Std. 4 Std. 37,5 Std. 4 Std. 37,5 Std.

365. Tag	0/33	0/32	0/31	1/30	2/31	2/33	5/33
600. Tag	0/33	0/32	0/31	3/30	3/31	4/33	6/33
730. Tag	1/33	0/32	0/31	4/30	3/31	8 ^a /33	9 ^b /33

Tab. 11: Tiere mit Nierentumoren nach einmaliger Injektion von 10, 20 oder 30 mg/kg DMN
 4 bzw. 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie

a = Ein Tier mit zwei Tumoren in der verbleibenden Niere

b = Zwei Tiere mit zwei Tumoren in der verbleibenden Niere

tet, das nach 24 Monaten getötet wurde. Es handelte sich um ein hochdifferenziertes tubulo-papilläres Adenom, das im Paraffinschnitt eine Fläche von etwa $0,3 \text{ mm}^2$ hatte und in das Lumen einer Zyste einwuchs.

Nach 20 mg/kg DMN ist zwar die Gesamtzahl der Tiere mit Nierentumoren in der G_1 -Phase mit 4 von 30 (= 13,3 %) im Vergleich zu 3 von 31 (= 9,7 %) in der S-Phase geringfügig höher. Doch ist bemerkenswert, daß der einzige anaplastische Tumor nach dieser Dosis bei einem in der S-Phase injizierten Tier auftrat. Der sarkom-ähnliche Tumor hatte eine Größe von $2,8 \times 2 \text{ cm}$ und führte nach zwölf Monaten zum Tode des Tieres.

Auch nach 30 mg/kg DMN war der größte, $3,6 \times 2,5 \text{ cm}$ messende Tumor der beiden Tiergruppen ein spindelzelliges Sarkom, das nach zwölf Monaten zum Tod des Tieres führte. Es fällt auf, daß nach Ablauf eines Jahres in der S-Phase insgesamt fünf Tumoren nachweisbar sind im Gegensatz zu zwei Tumoren in der G_1 -Phase. Möglicherweise ist die Induktionszeit der Tumoren kürzer, wenn DMN zum Zeitpunkt der maximalen DNA-Synthese gegeben wird.

Nach 730 Tagen ist die Gesamtzahl der Tiere mit Nierentumoren mit 9 von 33 (= 27,2 %) bei Applikation von DMN 37,5 Std. p.Op. nur geringfügig höher als nach 4 Std. mit 8 von 33 Tieren (= 24,2 %). Bei der in der S-Phase injizierten Tiergruppe hatten zwei Tiere zwei deutlich voneinander abgrenzbare Tumoren in der verbleibenden Niere: Ein nach 20 Monaten getötetes Tier wies einen mäßig und einen gering differenzierten Tumor auf, ein nach 24 Monaten getötetes Tier zwei mäßig differenzierte Tumoren. Nur ein Tier der nach 4 Std. injizierten Gruppe wies zwei Tumoren auf: In der Niere des nach 24 Monaten getöteten Tieres konnte ein hoch sowie ein gering differenzierter Tumor nachgewiesen werden.

3.5 Beziehung zwischen Tumorgröße und Differenzierungsgrad

Die epithelialen Tumoren entstehen überwiegend in den äußeren Anteilen der Nierenrinde. Sie sind in der Regel gut abgegrenzt und weisen ein vorwiegend expansives Wachstum auf. Die umgebenden Tubuli werden häufig komprimiert, so daß das Bild einer Pseudokapsel entstehen kann.

Histologisch handelt es sich um Tumoren mit vorwiegend basophilem und eosinophilem Zytoplasma. Die Dignität dieser klinischen Tumoren stellt ein besonderes Problem dar. Eine Einteilung in Adenome und Adenocarcinome ist nur bedingt möglich, da morphologische Kriterien wie Tumorgröße, Hämorrhagien und Nekrosen, zelluläre Pleomorphie, mitotische Aktivität und Infiltration in das umgebende Parenchym keine eindeutigen Kriterien für die Benignität oder Malignität der Tumoren sind.

Die beobachteten hoch differenzierten Tumoren wiesen eine überwiegend tubuläre (Abb. 19), in zwei Fällen eine papilläre Struktur in Kombination mit Zysten auf. Sie erreichten eine Querschnittsfläche bis 5 mm^2 . Das Cytoplasma der Tumorzellen war überwiegend basophil, die Kerne klein und relativ regelmäßig (Abb. 20).

Mäßig differenzierte Tumoren zeigten eine ausgeprägte Kernpolymorphie (Abb. 22 und 23). Mitosen waren häufig. Das von feinen Bindegewebssepten und von optisch leeren Vakuolen durchsetzte Tumorgewebe (Abb. 21 u. 22) zeigte eine tubulo-trabekuläre Struktur. Die Tumorperipherie war in der Regel scharf durch eine Pseudokapsel abgegrenzt, in einem Fall konnte eine Infiltration in das benachbarte Nierengewebe nachgewiesen werden (Abb. 24). Tumoren, die größer als 5 mm^2 waren, wiesen zentrale, zum Teil ausgedehnte Hämorrhagien und Nekrosen auf.

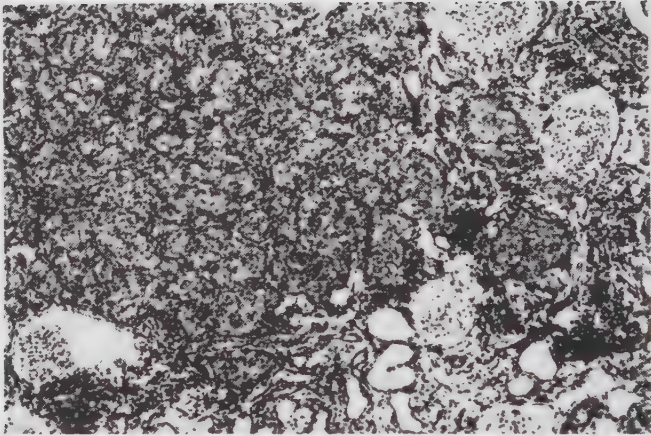


Abb. 19: Hoch differenzierter Tumor mit tubulärer Struktur nach 30 mg DMN 4 Std. p.Op. (HE, x 100)

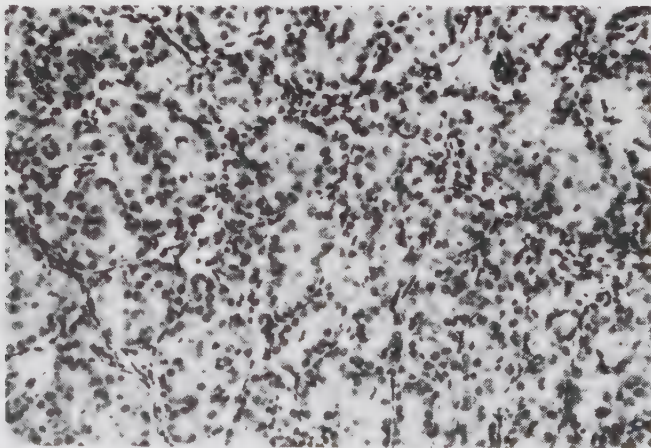


Abb. 20: Gleicher Tumor bei stärkerer Vergrößerung. Kleine, relativ regelmäßige Kerne mit überwiegend basophilem Zytoplasma (HE, x 250)

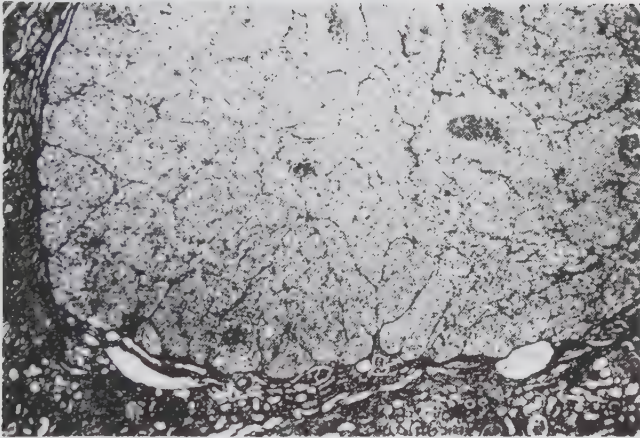


Abb. 21: Mäßig differenzierter Tumor mit tubulo-trabekulärer Struktur nach 20 mg DMN 37,5 Std. p.Op. Im Zentrum einzelne Nekroseherde (HE, x 40)

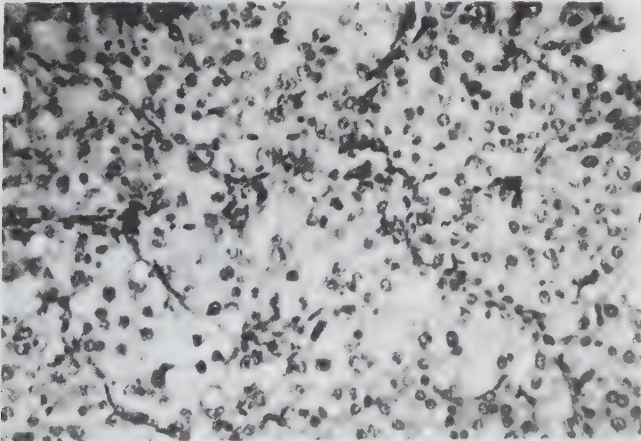


Abb. 22: Gleicher Tumor bei stärkerer Vergrößerung. Ausgeprägte Polymorphie der Kerne. Tumorgewebe von optisch leeren Vakuolen durchsetzt (^3H -TdR, HE, x 250)

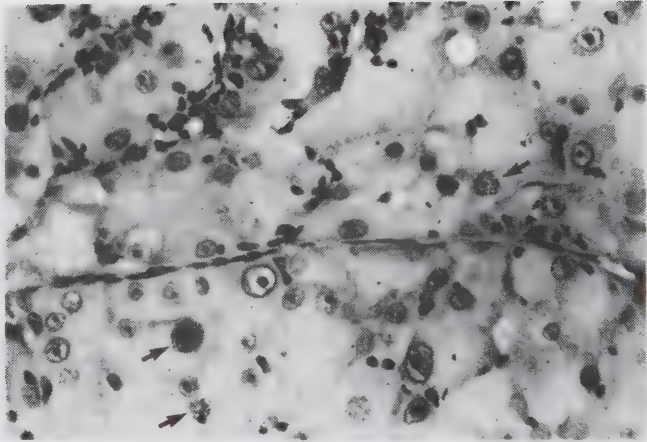


Abb. 23: ^3H -Thyminidin-markierte Zellen ($\rightarrow$) in einem mäßig differenzierten Tumor nach 20 mg DMN 4 Std. p.Op.. Ausgeprägte Polymorphie der Kerne (^3H -TdR, HE, x 400)

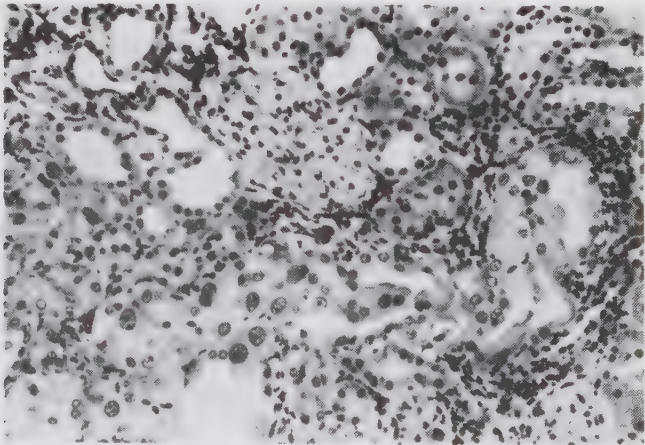


Abb. 24: Tumorperipherie eines mäßig differenzierten Tumors nach 30 mg DMN 37,5 Std. p.Op.. Infiltration des Tumors in das umgebende Parenchym. Teilweise pseudo-papilläre Strukturen (HE, x 250)

Abgesehen von einer Ausnahme wiesen sämtliche geringgradig differenzierte Tumoren eine Querschnittsfläche von mehr als 2 mm^2 auf. Sie wurden wie die mäßig differenzierten Tumoren überwiegend durch eine aus komprimiertem Nierenparenchym bestehenden Pseudokapsel begrenzt. Zwei Zellarten dominierten: Klarzellige, von feinen Bindegewebssepten durchzogene Anteile mit kleinen, chromatindichten Kernen sowie solide, granuliertzellige Anteile mit größeren Kernen, deren Chromatin aufgelockert erschien (Abb. 25 u. 26). Zwei über 50 mm^2 messende granuliertzellige Tumoren wiesen tubulo-papilläre Strukturen auf.

Die kleinen bis 5 mm^2 großen anaplastischen Tumoren waren unscharf begrenzt und infiltrierten in das umliegende Parenchym (Abb. 27). Die basophilen, oval bis spindelligen Zellen glichen Fibroblasten, die Kerne waren unregelmäßig geformt. Die Tubuli wurden offensichtlich von den Tumorzellen auseinander gedrängt und teilweise komprimiert (Abb. 28).

Die bis zu 3,6 cm im Durchmesser großen anaplastischen Tumoren bestanden überwiegend aus an kollagenen Fasern reichem Gewebe, das von Zysten, Nekrosen und Hämorrhagien durchsetzt war.

Die spindelförmigen Zellen mit dichtem Kern und spärlichem Cytoplasma umgaben zum Teil in dichten Zellagen Tubuli und Glomerula, die dem vorbestehenden Nierenparenchym zuzuordnen sind. Gelegentlich traten im Tumorzentrum dichtgelagerte Sarkomzellen auf, die in konzentrisch geschichteten Lagen das Bild von Pseudotubuli boten.

In den Tab. 12 und 13 werden die Nierentumoren nach ihrer Größe unter Berücksichtigung des Intervalls zwischen unilateraler Nephrektomie und Zeitpunkt der DMN-Injektion und nach dem Differenzierungsgrad aufgeschlüsselt.

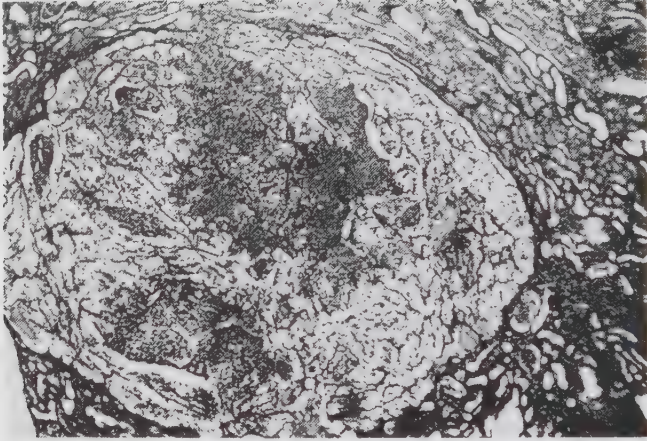


Abb. 25: Gering differenzierter Tumor mit trabekulärer bis medullärer Struktur nach 20 mg DMN 4 Std. p.Op. Kompression des umgebenden Parenchyms mit Bildung einer Pseudokapsel (HE, x 25)

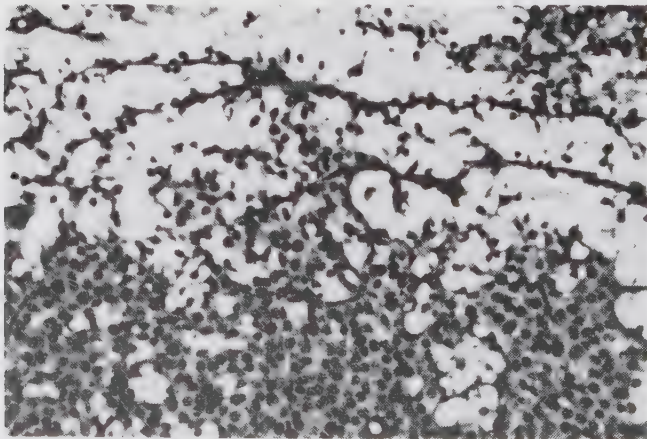


Abb. 26: Gleicher Tumor bei stärkerer Vergrößerung. Klarzellige, von feinen Bindegewebssepten durchzogene Anteile mit chromatindichten, kleinen Kernen. Solide granuliert zellige Anteile mit größeren Kernen, deren Chromatin aufgelockert erscheint (HE, x 250)

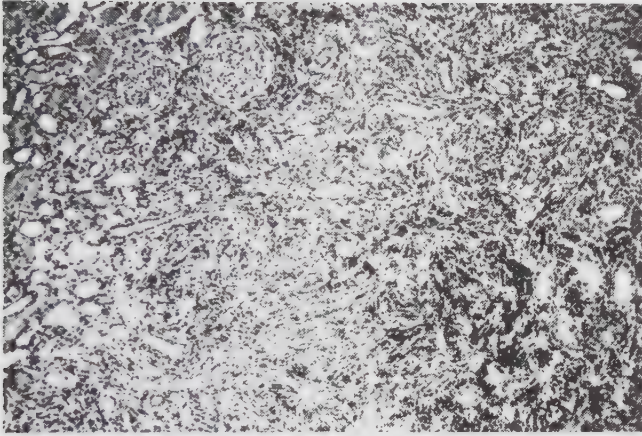


Abb. 27: Ausschnitt eines kleinen anaplastischen Tumors im Bereich der Nierenrinde nach 30 mg/kg DMN 4 Std. p.Op.. Diffuse Infiltration in das umgebende Parenchym (HE, x 100)

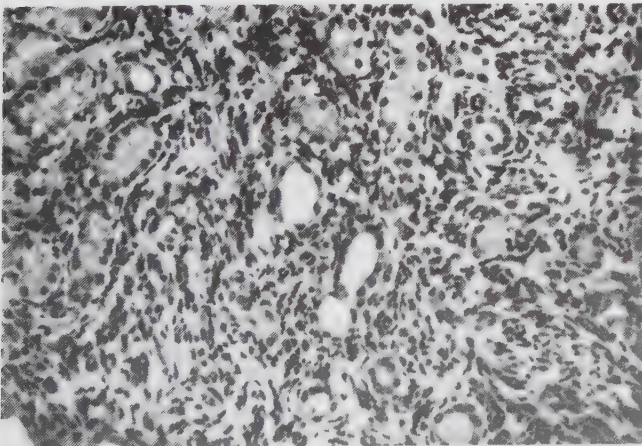


Abb. 28: Stärkere Vergrößerung desselben Tumors. Die oval bis spindeligen Zellen wachsen diffus im interstitiellen Raum und komprimieren teilweise die Tubuli (HE, x 250)

Tumorschnitt- fläche (mm ²)	Intervall zwischen unilat. Nephrektomie und DMN (in Std.)	Tumorzahl	Differenzierungsgrad		
			hoch	mäßig	gering anaplastisch
0 - 1,9	4	1	1		
	37,5	1			1
2 - 5	4	2 ^a		1	
	37,5	-			
6 - 20	4	1			1
	37,5	1		1	
21 - 100	4	-			
	37,5	-			
über 100	4	-			
	37,5				
					1
					88
					1

Tab. 12: Beziehungen zwischen Tumorgroße der durch DMN induzierten Nierentumoren und

Differenzierungsgrad sowie Wachstumsverhalten unter Berücksichtigung des Inter-

valls zwischen unilateraler Nephrektomie und Zeitpunkt der Injektion von 20 mg/kg DMN

^a = aufgrund hochgradiger Autolyse nicht klassifizierbarer Tumor

Tumorschnitt- fläche (mm ²)	Intervall zwischen unilat. Nephrektomie und DMN (in Std.)	Tumorzahl	Differenzierungsgrad		
			hoch	mäßig	gering anaplastisch
0 - 1,9	4	4	3	1	
	37,5	4	1	2	1
2 - 5	4	4	1	1	1
	37,5	2 ^a		1	
6 - 20	4	-			
	37,5	2		1	
21 - 100	4	1		1	
	37,5	-			
über 100	4	-			
	37,5	3		1	1
					89

Tab. 13: Beziehungen zwischen Tumorgröße der durch DMN induzierten Nierentumoren und

Differenzierungsgrad sowie Wachstumsverhalten unter Berücksichtigung des Inter-

valls zwischen unilateraler Nephrektomie und Zeitpunkt der Injektion von 30 mg/kg DMN

a = aufgrund hochgradiger Autolyse nicht klassifizierbarer Tumor

Nach 20 mg/kg DMN (Tab. 12) wiesen von den insgesamt sieben beobachteten Tumoren vier einen mäßigen bis geringen Differenzierungsgrad auf, ein Tumor war hochdifferenziert, bei einem Tumor war aufgrund hochgradiger Autolyse eine genaue Einstufung nicht mehr möglich. Der einzige anaplastische Tumor war mit Abstand der größte und trat nach Injektion von DMN in der S-Phase auf.

Nach 30 mg/kg DMN (Tab. 13) ist für beide Injektionszeitpunkte keine sichere Beziehung zwischen Größe und Differenzierungsgrad erkennbar. Es fällt lediglich auf, daß sämtliche hochdifferenzierten Tumoren kleiner als 5 mm^2 sind. Von insgesamt 20 beobachteten Tumoren wiesen 11 einen mäßigen bis geringen Differenzierungsgrad auf, drei waren anaplastisch, ein autolytischer Tumor war nicht klassifizierbar. Im Gegensatz zu den Tieren, die 20 mg/kg DMN erhielten, sind nach 30 mg/kg DMN drei mäßig bis gering differenzierte Tumoren nachweisbar, die größer als 20 mm^2 sind.

Daneben konnten zwei frühe Stadien von anaplastischen Tumoren nachgewiesen werden: Bei einem zwölf Monate alten Tier, das DMN 37,5 Std. p.Op. erhalten hatte, handelte es sich um einen etwa $1,7 \text{ mm}^2$ großen anaplastischen Tumor, der diffus in das Nierenparenchym infiltrierte. Der zweite, etwa 4 mm^2 messende Tumor (Abb. 27) trat bei einem Tier auf, das nach 20 Monaten getötet wurde. Bemerkenswert ist, daß das Tier trotz der relativ kleinen Größe des Tumors multiple Lungenmetastasen aufwies, die zum Teil wesentlich größer als der Primärtumor waren.

Berücksichtigt man den Differenzierungsgrad der Tumoren in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt, so zeigt sich, daß bei Injektion von 20 mg/kg DMN in der G_1 -Phase (Tab. 12) ausschließlich epitheliale Tumoren auftreten. Die in der S-Phase initiierten Tumoren teilen sich in einen anaplastischen und zwei epitheliale auf. Somit beträgt die Inzidenz an epithelialen Geschwülsten für beide Gruppen zusammen 85,7 % (6 von 7 Tumoren) im Vergleich zu 14,3 % (1 von 7) an anaplastischen Tumoren.

Korreliert man den Differenzierungsgrad mit dem Injektionszeitpunkt nach 30 mg/kg DMN (Tab. 13), so überwiegen wiederum für beide Gruppen die epithelialen Tumoren: Mit 8 von 9 (= 88,9 %) epithelialen Geschwülsten ist das Vorkommen dieser Tumoren in der G₁-Phase etwas höher als in der S-Phase mit 8 von 10 Tumoren (= 80 %).

Zusammengefaßt ergeben sich nach 30 mg/kg DMN 84,2 % (16 von 19 Tumoren) epitheliale Neoplasien im Vergleich zu 15,7 % (3 von 19) anaplastischen Tumoren.

3.6 Beziehung zwischen Differenzierungsgrad und Markierungsindex der Tumoren

Im Gegensatz zu menschlichen renalen Adenocarcinomen (Rabes et al. 1979/a), konnten bei der vorliegenden Untersuchung keine signifikanten Unterschiede im Student T-Test ($p < 0,05$) in bezug auf die proliferative Aktivität der hoch, mäßig und gering differenzierten Tumoren gefunden werden (Tab. 14). Die Mittelwerte der Markierungsindices liegen für gering differenzierte Tumoren etwas höher im Vergleich zu mäßig bzw. hoch differenzierten Tumoren.

Differenzierungs- grad	³ H-Thymidin- Markierungsindex		Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD)
	Tumor	Nierenrinde	
hoch (n = 5)	0,30	0,10	
	0,49	0,40	
	1,28	0,10	MW = 1,69
	2,34	0,10	SD = 1,54
	4,04	0,50	
mäßig (n = 8)	0,30	0,10	
	0,50	0,30	
	1,15	0,20	
	1,46	0,10	MW = 1,88
	1,54	0,49	SD = 1,30
	3,22	0,30	
	3,42	0,30	
	3,48	0,20	
gering (n = 3)	1,65	0,20	
	1,84	0,20	MW = 2,31
	3,43	0,50	SD = 0,98
anaplastisch (n = 1)	1,38	0,10	-

Tab. 14: Beziehung zwischen dem Differenzierungsgrad der DMN-induzierten Tumoren und dem ³H-Thymidin-Markierungsindex

Der Markierungsindex des anaplastischen Tumors erscheint mit 1,38 relativ niedrig. Dennoch setzte er multiple Metastasen in

die Lunge, die zum Teil eine deutlich höhere proliferative Aktivität als der Primärtumor aufwiesen, wobei die Höhe des Markierungsindex unabhängig von der Größe der Metastasen war.

Lungenmetastasen eines anaplast.	Markierungsindex ^a			Mittelwert
Tumors (n = 9)	0,30	0,89	1,76	1,65
	0,73	1,36	2,70	
	0,76	1,67	4,62	

Tab. 15: Markierungsindex in Lungenmetastasen eines anaplastischen Nierentumors nach 30 mg/kg DMN 4 Std. nach unilateraler Nephrektomie

^a = jeweils 1000 Zellen wurden ausgezählt

Bei den hoch bis gering differenzierten epithelialen Tumoren konnten auch bei hohem Markierungsindex der Malignome in keinem Fall Metastasen nachgewiesen werden.

3.7 Organverteilung der DMN-induzierten Tumoren und Spontantumoren

Tab. 16 gibt eine zusammenfassende Übersicht über die durch DMN induzierten Tumoren sowie die Spontantumoren.

Bei dem Nierentumor der Kontrollgruppe handelt es sich um ein papilläres Adenom, das in das Lumen einer Zyste einwuchs. Dieses histologische Bild entspricht Befunden von Eker (1954), der bei Wistar Ratten ein gehäuftes Auftreten von cystisch-papillären Adenomen beschrieb.

	Kontrollen		10 mg/kg		20 mg/kg		30 mg/kg	
			4 Std.	37,5 Std.	4 Std.	37,5 Std.	4 Std.	37,5 Std.
Gesamtzahl der Tiere	33	32	31		30	31	33	33
Nierentumoren	1	-	-		4	3	9	11
Tiere mit 2 Tumoren in der Niere							1	2
Cholangiom der Leber			1		1		2	1
Adenopapilläres Bronchuscarcinom								1
Polymorphzelliges Sarkom an der Operationsnarbe						1		
Undifferenziertes spindelzelliges Sarkom der vorderen Brustwand							1	
Undifferenziertes anaplastisches Carcinom der Prostata			1					
Metastasiertes malignes Melanom des Auges			1					

Tab. 16: Organverteilung der durch DMN induzierten Tumoren

Die selektive Induktion von Cholangiomen der Leber durch DMN ist möglicherweise als Hinweis zu werten, daß nicht-parenchymale Zellen der Leber offensichtlich nicht in ausreichendem Maß imstande sind, DMN-induzierte Gen-Alterationen zu reparieren. Auch bei hohen DMN-Dosen treten keine hepatozellulären Carcinome auf. Über die mangelnde Reparaturkapazität nicht-parenchymaler Zellen für O⁶ meGua nach 1,2 Dimethylhydrazin und das gehäufte Auftreten von Angiosarkomen wurde von Swenberg (1982) berichtet. Die Tumorzahlen sind jedoch zu gering, um schlüssige Aussagen machen zu können. Bei den restlichen Tumoren handelt es sich um Einzelbefunde. Lungentumoren nach DMN wurden in sehr geringer Inzidenz von Zak et al. (1960) beobachtet, ebenso Malignome an Operationsnarben (Fridmann-Manduzio 1977).

3.8 Zusatzversuch: Der ³H-Thymidin-Markierungsindex in der regenerierenden Rattenniere nach 24stündiger HU-Blockade

In Tab. 17 und Abb. 29 ist der Verlauf der Regeneration in der proliferierenden Niere nach sechsmaliger intraperitonealer Injektion von 0,5 mg HU/g KG von der 22. bis zur 42. Std. nach unilateraler Nephrektomie dargestellt. Nach insgesamt 24stündiger Blockade (22. - 46. Std. p.Op.) ist keine Proliferation in den Tubuluszellen nachweisbar. Dies spricht für eine vollständige Inhibition der DNA-produzierenden Zellen. 3 bzw. 6 Std. nach HU-Block steigt der Markierungsindex allmählich an, um nach 9 Std. mit 6,67 % ein Maximum zu erreichen. Die ersten Mitosen sind nach 12 Std. nachweisbar, der Mitoseindex liegt mit 1,04 etwa um den Faktor 6 niedriger als der Markierungsindex.

Im stratum subcorticale (Ergebnisse nicht abgebildet), beginnt die Proliferation deutlich später. 9 Std. nach HU-Blockade proliferieren 1,46 % der Zellen, das Maximum ist 12 Std. nach HU mit einem Markierungsindex von 1,83 % erreicht. 15 Std. nach HU sind keine markierten Zellen mehr nachweisbar.

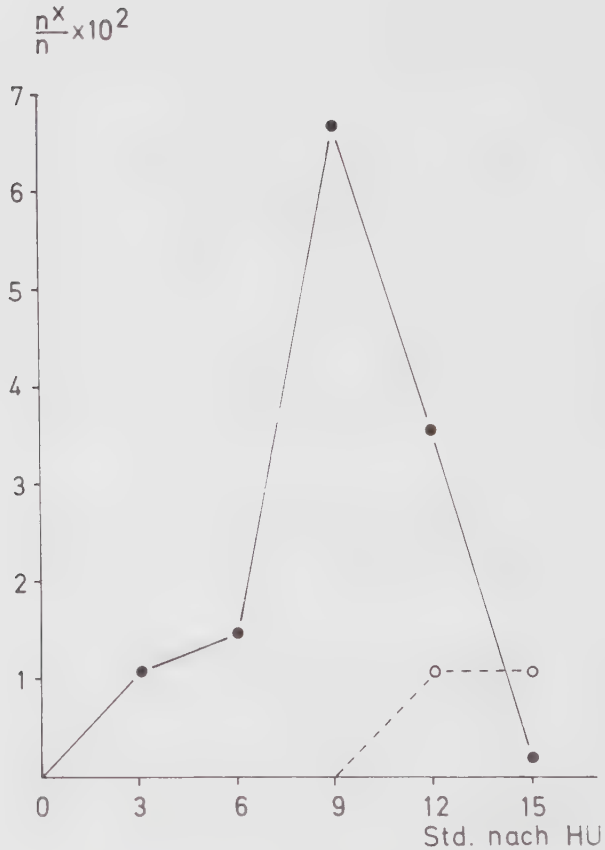


Abb. 29: ^3H -Thymidin-Markierungs- sowie Mitoseindex der Tubulusepithelien im stratum labyrinthicum der Niere in Abhängigkeit von der Zeit nach Hydroxyharnstoff-Applikation ($6 \times 0,5 \text{ mg HU/g KG i.p.}$ von der 22. bis 42. Std. nach unilateraler Nephrektomie)

n^x = ^3H -TdR-markierte Zellen
 n = Gesamtzahl der Zellen

● = Markierungsindex
○ = Mitoseindex

Tötungszeitpunkt		Markierungsindex	Mitoseindex
Std. p.Op.	Std. p. HU		
46	0	0	0
49	3	1,17	0
52	6	1,47	0
55	9	6,67	0
58	12	3,51	1,04
61	15	0,19	1,06

Tab. 17: Abhängigkeit des Markierungs- und Mitoseindex von der Zeit nach unilateraler Nephrektomie bzw. nach Hydroxyharnstoff-Applikation (6 x 0,5 mg HU/g KG i.p. von der 22. bis zur 42. Std. p.Op.)

Diese Befunde überraschen, da nach suffizienter HU-Blockade ein deutlich höherer Synchronisationsgrad und damit ein höherer Markierungsindex zu erwarten wäre. Die gefundenen Werte liegen etwa in der gleichen Größenordnung wie das Proliferationsmaximum nach unilateraler Nephrektomie ohne Hydroxyharnstoff (Heine et al. 1971).

Eine schlüssige Erklärung dieser Befunde kann nicht gegeben werden. Bei der verwendeten Dosis beobachteten Rajewsky et al. (1971) nach einer Blockdauer von 10 Std. cytotoxische Effekte an der Leber und der Milz von Marshall Ratten, die sowohl proliferierende als auch nicht proliferierende Zellen betraf. Nach sechsmaliger HU-Applikation von 0,5 mg/g KG ist nicht sicher auszuschließen, daß proliferierende Tubuluszellen während der 24stündigen HU-Blockade geschädigt wurden, obwohl im vorliegenden Versuch keine nekrotischen Zellen nachgewiesen werden konnten. Demgegenüber berichten Farber und Baserga (1969), daß HU in

einer einmaligen Dosis von 1,5 mg/g KG nur an Organen mit kontinuierlicher Zellteilung wie z.B. den Jejunal-Krypten oder den Keimzentren von Lymphfollikeln zu Nekrosen führt, nicht jedoch an physiologischerweise ruhenden Organen. Nach Stimulation der Rattenniere durch Folsäure sind nach 1,5 mg/g KG HU keine Nekrosen nachweisbar.

Insgesamt gesehen, scheint trotz der geringen Tierzahl und der relativ langen Tötungsintervalle nach HU-Blockade die Aussage zulässig, daß an der regenerierenden Rattenniere durch HU eine ähnlich wirksame Synchronisation der Zellzykluskompartimente wie in der Leber nicht zu erzielen ist. Die Voraussetzungen für eine Zellzyklus-orientierte Carcinogenapplikation werden durch HU offensichtlich nicht entscheidend verbessert.

4. DISKUSSION

=====

Die Bedeutung der Proliferation für die maligne Transformation konnte in vivo bisher schon für mehrere Organsysteme nachgewiesen werden. Die Tumorzinzidenz steigt deutlich an, wenn chemische Carcinogene zum Zeitpunkt einer gesteigerten proliferativen Aktivität der Ziel-Organen appliziert werden (Übersicht bei Rabes 1979). Am Modell der HU-synchronisierten Rattenleber konnte die erhöhte Sensitivität proliferierender Zellpopulationen gegenüber der initiierenden Wirkung chemischer Carcinogene eindrucksvoll dargestellt werden, da die Synchronie der Zellzykluskompartimente hoch ist (Rabes et al. 1977).

In Untersuchungen über die Korrelation der DNA-Basen-Alkylierung in verschiedenen Phasen des Zellzyklus und dem carcinogenen Effekt einer einmaligen DMN-Dosis konnte gezeigt werden, daß die kritische Determinante im Rahmen der malignen Transformation offensichtlich nicht die absolute Höhe des promutagenen O^6 meGua zu sein scheint, sondern die Position der Zielzellen im Zellzyklus (Rabes et al. 1979/b). Nach Ablauf von zwei Jahren entstehen Lebertumoren nur nach DMN-Applikation in der S-Phase, nicht nach DMN-Gabe in der G_1 - oder G_2M -Phase. Der O^6 meGua / 7 meGua Quotient ist jedoch in der S-Phase erniedrigt, was auf eine erhöhte Reparaturkapazität DNA-synthetisierender Zellen für O^6 meGua schließen läßt.

Ohne HU-Infusion beträgt die Zahl der Hepatozyten, die sich nach partieller Hepatektomie gleichzeitig in der DNA-Synthese befinden, etwa 30 % (Rabes u. Brändle 1969). Es kommt aufgrund des gestaffelten Beginns der DNA-Synthese zur Überschneidung der Zellzykluskompartimente und damit zu Unschärfen bei der quantitativen Analyse zellzyklusbezogener Transformationssensitivität.

Ähnliche Verhältnisse liegen bei der regenerierenden Niere nach unilateraler Nephrektomie vor. Die eindeutige Zuordnung eines carcinogenen Effekts zu Zellen, die sich selektiv in der G_1 - oder in der S-Phase befinden, ist nur mit Einschränkungen möglich. 38 Std. nach unilateraler Nephrektomie, dem Zeitpunkt maximaler DNS-Syntheseaktivität, sind nur etwa 6 % der Tubuluszellen im stratum labyrinthicum der verbleibenden Niere gleichzeitig in der S-Phase (Heine u. Stöcker 1971). Es ist außerdem zu berücksichtigen, daß bei hohen Dosen von DMN die Zahl DNA-synthetisierender Zellen deutlich supprimiert wird, was allerdings ebenso für andere Modelle zutrifft.

Da eine HU-Blockade an der regenerierenden Niere im Gegensatz zur Leber die Synchronie der Zellzykluskompartimente nicht erhöht (siehe 2.8), wurde versucht, am partiell synchronisierten Organ die Korrelation zwischen der molaren Fraktion des O^6 meGua, der Position von Target-Zellen im Zellzyklus und der Tumorzinzidenz zu analysieren, wobei DMN-Dosen von 10, 20 und 30 mg/kg alternativ in der G_1 - oder in der S-Phase appliziert wurden.

Nach 10 mg/kg sind im biologischen Versuch nach Ablauf von zwei Jahren keine Tumoren nachweisbar. Dies steht im Einklang mit Angaben aus der Literatur, wonach die niedrigste Dosis DMN, nach der bei einmaliger Applikation am intakten Tier Nierentumoren nachweisbar sind, bei 18 mg/kg liegt (Murphy et al. 1966). Werden Ratten vor Applikation des Carcinogens partiell hepatektomiert, so treten auch schon nach 9 mg/kg DMN Nierentumoren auf (Fridmann-Manduzio et al. 1977). Dies ist wahrscheinlich durch ein vermehrtes Angebot von DMN an die Niere erklärbar, da das Restparenchym des partiell hepatektomierten Organs eine geringere Metabolisierungsrate aufweist, als die intakte Leber.

Im biochemischen Versuch ergaben sich nach 10 mg/kg DMN deutliche Unterschiede in der molaren Fraktion des O^6 meGua zwischen

G₁- und S-Phasen-Exposition. Der O⁶ meGua / 7 meGua Quotient ist in der S-Phase deutlich niedriger als in G₁. Die Aktivität des in den letzten Jahren gut charakterisierten Enzyms O⁶ meGua-DNA-Methyltransferase, das die Methylgruppe des O⁶ meGua auf den Cystein-Rest eines Rezeptor-Proteins überträgt und damit Guanin in der DNA regeneriert (Pegg 1983), ist offensichtlich nicht nur in der Leber (Rabes 1982/b), sondern auch in der regenerierenden Niere während der S-Phase erhöht. Nach dieser Dosis ist die Reparaturkapazität an der Niere offenbar nicht ebenso schnell erschöpft wie an der Leber: Das promutagene Alkylierungsprodukt wird wohl noch rechtzeitig vor der folgenden Zellreplikation eliminiert, so daß eine Fixierung des DNA-Schadens in Form von Basenfehlpaarungen während der DNA-Replikation (Gerchmann u. Ludlum 1973, Abbott u. Saffhill 1979) ausbleibt. Tumoren entstehen nicht. Da ein bleibender genotoxischer Effekt allerdings nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, muß man annehmen, daß das Ausmaß dieser Schädigung nicht ausreicht, während der Lebenserwartung der Tiere Tumoren entstehen zu lassen. Die niedrige einmalige DMN-Dosis von 10 mg/kg ist also zu gering, um eine zellzyklusspezifische Tumorinduktion an der Niere nachzuweisen.

Auch nach 20 und 30 mg/kg DMN ergeben sich keine eindeutigen zellzyklusspezifischen Unterschiede in der Tumorzinzidenz. Lediglich nach 30 mg/kg ist die Gesamtzahl der Nierentumoren mit 33 % nach DMN-Exposition in der S-Phase geringfügig höher als nach DMN in der G₁-Phase (27 %), wobei die Induktionszeit der in der S-Phase induzierten Tumoren angedeutet kürzer ist. Dies entspricht Befunden aus der biochemischen Untersuchung, wonach bei beiden Dosen der O⁶ meGua / 7 meGua Quotient in der gleichen Größenordnung liegt. Unterschiede in der Menge des promutagenen O⁶ meGua zwischen der G₁- und der S-Phase konnten somit nicht nachgewiesen werden. Unabhängig vom Zellzyklus ist offensichtlich die Kapazität der Methyltransferase bei Dosen über 20 mg/kg erschöpft, wie dies auch an der ruhenden Niere gezeigt werden

konnte (Nicoll et al. 1975). Bei der Dosis-Wirkungsbeziehung ist zu berücksichtigen, daß nach unilateraler Nephrektomie mit einem vermehrten DMN-Angebot an die verbleibende Niere gerechnet werden muß.

Über die Eliminationskinetik von O^6 meGua in Relation zum Ausmaß der reaktiven Proliferation nach der zu erwartenden Suppression der DNA-Synthese (Steward u. Magee 1971) nach 20 und 30 mg/kg DMN liegen bisher keine Daten vor. Deshalb wären autoradiographische Untersuchungen in kurzen Zeitintervallen nach Carcinogen-Applikation zur Bestimmung der aktuellen Proliferationsrate von großem Interesse. Bei Kenntnis dieser Daten könnte Bildung und Persistenz von O^6 meGua bei Dosen zwischen 10 und 20 mg/kg DMN schärfer mit Zellzyklusparametern korreliert werden, als dies mit den vorliegenden Ergebnissen möglich ist.

Von großem Interesse wären ferner Untersuchungen über die Reparaturkapazität transformierter Tubuluszellen vom Stadium der frühen Praeneoplasie bis hin zum klinisch manifestierten Tumor. In neueren Untersuchungen über die Aktivität der O^6 meGua-DNA-Methyltransferase in menschlichen Tumoren im Vergleich zum normalen Gewebe (Myrnes et al. 1984) ergab sich der interessante Einzelbefund, daß in einem Hypernephrom als Reparaturkapazität nur etwa 14 % der Aktivität des normalen Nierengewebes nachweisbar war. Ferner wiesen von insgesamt sieben untersuchten Magentumoren vier eine signifikant erniedrigte Aktivität der Methyltransferase im Vergleich zum normalen Magengewebe auf. Demgegenüber war die Aktivität des Enzyms in Tumoren der Lunge, des Colons und des Rectums höher als im Normalgewebe. Bei Hirntumoren ergaben sich unterschiedliche Reparaturkapazitäten für verschiedene Tumortypen: Meningeome und Neurinome wiesen eine höhere, Gliome dagegen eine niedrigere Aktivität im Vergleich zum normalen Hirngewebe auf (Wiestler et al. 1984). Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese zum Teil widersprüchlichen Befunde zu klären. Eine reduzierte Reparaturkapazität von normalen Zel-

len erhöht möglicherweise das Transformationsrisiko. Die verminderte Aktivität in neoplastischem Gewebe bestimmter Organe könnte ein Hinweis sein, daß Reparatur-defiziente Zellen preferentiell transformiert werden.

Inwieweit sich die Reparaturkapazität von DMN-induzierten Nierentumoren in der Frühphase der Neoplasie sowie in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Tumoren vom Normalgewebe unterscheidet, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Trotz geringer zellzyklusspezifischer Unterschiede in bezug auf die Tumorzinzidenz und das Alkylierungsmuster bei hohen Dosen ergeben sich am Modell der regenerierenden Rattenniere wesentliche Differenzen im Gewichtsverlauf und der Überlebensrate nach DMN-Applikation. Die toxische Wirkung von 30 mg/kg DMN ist bei Applikation 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie offensichtlich deutlich höher als bei Applikation 4 Std. p.Op., da die Tiere nach Injektion des Carcinogens in der S-Phase prolongiert bis zum sechsten Tag p.Op. an Gewicht verlieren, wogegen in der G₁-Phase injizierte Tiere schon nach dem zweiten postoperativen Tag wieder an Gewicht zunehmen (Abb. 17 u. 18). Bemerkenswert ist ferner der ausgeprägte Anstieg der Mortalität bei Ratten, die 30 mg/kg DMN zum Zeitpunkt der maximalen Regeneration der verbleibenden Niere erhielten. Bis zum vierten Tag nach Carcinogenapplikation verstarben nach DMN-Gabe in der S-Phase 42,1 % der insgesamt operierten Tiere im Gegensatz zu nur 19,5 % nach DMN in der G₁-Phase.

Eine schlüssige Erklärung dieser Befunde ist zwar zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich, doch scheint folgende Überlegung sinnvoll: Da DMN überwiegend in der Leber metabolisiert wird (Knecht 1967), ist das Ausmaß des Leberschadens, der sich morphologisch als hämorrhagische, zentrilobuläre Nekrosen verifizieren läßt, möglicherweise abhängig von endokrinen und metabolischen Veränderungen in der postoperativen Phase. Aus der

Humanpathophysiologie ist bekannt, daß postoperativ neben einem erhöhten Eiweißkatabolismus der periphere Glucosespiegel unter anderem durch den Anstieg von Katecholaminen und Glucocorticoiden erhöht ist. Diese hormonell bedingte Reaktion könnte zusammen mit der zu beobachtenden Nahrungskarenz der Tiere eine Stoffwechselsituation in der Leber herbeiführen, die einer kohlenhydratreichen, proteinarmen Diät ähnelt. Durch eine derartige Diät läßt sich die toxische Wirkung von DMN deutlich herabsetzen (Hard 1970/a). 37,5 Std. nach unilateraler Nephrektomie haben sich die Tiere offensichtlich wieder vollständig erholt und entsprechend ist die Mortalität (42 %) mit der von nicht-operierten Tieren vergleichbar (Magee u. Barnes 1962). Ohne entsprechende laborchemische Daten müssen diese Überlegungen jedoch spekulativ bleiben.

Im Rahmen der morphologischen Untersuchungen ergab sich nach einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren keine Beziehung zwischen dem Differenzierungsgrad der induzierten Tumoren und dem Injektionszeitpunkt nach unilateraler Nephrektomie. Es überwiegen deutlich epitheliale Tumoren: Nach 20 mg/kg DMN betrug die Inzidenz an epithelialen Geschwülsten 85,7 % (6 von 7 Tumoren) im Vergleich zu 14,3 % (1 von 7 Tumoren) an anaplastischen Tumoren. Die nahezu gleiche prozentuale Relation zeigen die Tumoren nach 30 mg/kg DMN: 84,2 % (16 von 19 Tumoren) zeigten eine epitheliale Differenzierung, 15,7 % (3 von 19 Tumoren) waren anaplastisch. Diese Befunde stehen in scheinbarem Widerspruch zu Ergebnissen von Terracini u. Magee (1974), die an neugeborenen Wistar Ratten nach DMN-Applikation ausschließlich anaplastische Tumoren fanden. Wird hingegen DMN in einer Dosis von 60 mg/kg sechs Wochen alten Ratten appliziert, die vor Carcinogen-Applikation eine kohlenhydratreiche, proteinarme Diät erhalten, so beträgt der Anteil mesenchymaler Tumoren 100 %, die Inzidenz an epithelialen Geschwülsten 30 bis 50 % (Hard u. Butler 1970/a). Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß der Differenzierungsgrad der induzierten Tumoren neben metabolischen Variablen maßgeblich vom Alter der Tiere beeinflusst wird.

Dieser Zusammenhang konnte von Hard (1979) nachgewiesen werden: Gruppen von Ratten, die vor Carcinogen-Applikation fünf Tage proteinfrei, kohlenhydratreich ernährt wurden, erhielten in monatlichen Abständen eine einmalige DMN-Injektion von 30 mg/kg. Es zeigte sich, daß mesenchymale Tumoren in einer Häufigkeit von über 80 % bei Injektion im ersten Lebensmonat auftraten, bei Injektion von fünf Monate alten Tieren sank die Inzidenz von mesenchymalen Tumoren auf Null. Im Gegensatz dazu zeigten epitheliale Tumoren ein gehäuftes Auftreten mit zunehmendem Alter mit einem Maximum von 90 % der gefundenen Tumoren bei Injektion von drei Monate alten Tieren. Nach DMN-Injektion von zwei Monate alten Tieren, dem Alter der Ratten im vorliegenden Versuch, betrug der Anteil mesenchymaler Tumoren 15 %, der epithelialer Geschwülste 85 %. Die eigenen Ergebnisse stehen somit in gutem Einklang mit den Befunden anderer Autoren (Hard 1970).

Hoch differenzierte epitheliale Tumoren zeigten einen geringfügig niedrigeren ^3H -Thymidin-Markierungsindex als gering differenzierte, doch waren die Unterschiede nicht signifikant. Für menschliche Adenocarcinome konnte jedoch gezeigt werden, daß in papillären und solid tubulären Arealen sowie in der Peripherie solider Tumoranteile die Zahl der DNA-synthetisierenden Zellen ein Maximum zeigten, wogegen in hoch differenzierten Anteilen der Tumoren niedrigere Markierungsindices beobachtet wurden. Zudem war die Proliferationsrate in peripheren, infiltrierenden Tumorbezirken fokal deutlich erhöht (Rabes et al. 1979/a).

Diese Beobachtung wird durch den Einzelbefund eines mäßig differenzierten Adenocarcinoms bestätigt, dessen infiltrierender Anteil einen vierfach höheren Markierungsindex aufwies als das Tumorentum. Metastasen waren zum Tötungszeitpunkt (20 Monate nach DMN-Applikation) nicht nachweisbar.

Die mittlere Proliferationsrate des gesamten Primärtumores kann über das spezifische proliferative Verhalten von Subpopulationen

keinen Aufschluß geben. In anaplastischen Anteilen menschlicher Adenocarcinome schwankt der Markierungsindex erheblich, was auf eine hohe Heterogenität der Zellpopulation schließen läßt. Nur bestimmte, selektionierte Tumorzellen erlangen offensichtlich eine metastatische Potenz, wobei DNA-synthetisierende Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit nach Disseminierung überleben und zu klinisch manifesten Metastasen heranwachsen (Suzuki et al. 1977). Die große Schwankungsbreite der Markierungsindices in den Lungenmetastasen eines anaplastischen Tumors (Tab. 15) ist möglicherweise Ausdruck einer unterschiedlichen proliferativen Potenz der in die Blutbahn gelangten Tumorzellen des Primärtumors (Rabes 1984).

Bisher sind die Vorgänge bei der Entwicklung einer initiierten Zelle zur klinisch manifesten Neoplasie noch weitgehend ungeklärt. In der Zeitspanne zwischen der Applikation eines Carcinogens und der Manifestation eines Tumors fehlen eindeutige Kriterien, die es in der frühen Phase der Carcinogenese ermöglichen, morphologisch alterierte Zellen oder Zellgruppen als praeneoplastisch zu identifizieren. Im Tierexperiment haben sich im Rahmen dieser praeneoplastischen Latenzperiode enzymhistochemische, morphologische und autoradiographische Untersuchungsmethoden bewährt, um proliferative Vorgänge verschiedenen Stadien der Praeneoplasie zuordnen zu können. Detaillierte Untersuchungen sind darüber an der Rattenleber durchgeführt worden.

Durch enzymhistochemische Reaktionen lassen sich bei Gabe von Hepatocarcinogenen nach einigen Wochen Subpopulationen nachweisen, die sich vom umgebenden normalen Lebergewebe abgrenzen lassen. Diese "hyperplastischen Knoten" oder "enzymdefizienten Herde" beobachtet man lange, bevor ein Hepatom auftritt. Bei einer Vielzahl von Untersuchungen (Übersicht bei Emmelot u. Scherer 1980, Pitot und Sirica 1980) konnte man enzymaberrante Populationen nachweisen, die ein relatives Defizit an Adenosintriphosphatase (Rabes et al. 1970, 1972, Scherer et al. 1972), Glyko-

genphosphorylase (Epstein et al. 1967), Serin-Dehydratase (Kitagawa 1976), β -Glucuronidase (Kitagawa 1976) sowie mangelnde Eisenspeicherungsfähigkeit (Williams 1976) aufwiesen. Andererseits wurde in derartigen Zellpopulationen auch eine Zunahme von Gamma-glutamyltranspeptidase-Aktivität (Farber et al. 1976) beobachtet. Rabes et al. (1972) konnten an Untersuchungen über die Wachstumskinetik dieser praeneoplastischen Leberzellpopulationen zeigen, daß bei Ratten, denen täglich 5 mg/kg Diäthylnitrosamin gefüttert wurde, nach 30 Tagen Glucose-6-Phosphatase und Adenosin-triphosphatase-defiziente Herde nachweisbar wurden, die nach ^3H -Thymidin-Markierung einen mit den normalen Hepatozyten nahezu identischen Markierungsindex aufweisen. Die Zahl der enzymdefizienten Herde nimmt annähernd exponentiell bis zum 70. Tag zu. Vom 90. Tag an kommt es in einzelnen Herden zu einer im Vergleich zum normalen Parenchym und zu anderen Herden deutlich erhöhten Proliferation.

In morphologischen Untersuchungen fand Bannasch (1976) in Lebern von Ratten, denen Nitrosomorpholin oder Thioacetamid gefüttert worden war, hyperplastische, mit hoher Wahrscheinlichkeit neoplastische Knoten. Diese bestanden aus einer heterogenen Zellpopulation, die er in vier Typen von alterierten Hepatozyten einteilte: Klarzellige Glykogen-speichernde Zellen, acidophile Glykogen-speichernde Zellen, fettspeichernde Zellen sowie basophile Glykogen-arme Zellen. Zusätzlich beschrieb er verschiedene "intermediäre" Zellen. Das Glykogen dieser hyperplastischen Knoten kann nach Fasten nicht mobilisiert werden (Epstein et al. 1967, Bannasch 1968). Hyperplastische Knoten weisen häufig auch ein Defizit an Glucose-6-Phosphatase auf. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung des Glykogens, so daß sich bei Mangel Glykogen in diesen Zellen anhäufen könnte (Friedrich-Freska et al. 1969).

Autoradiographische Untersuchungen unterstreichen schließlich die Bedeutung der Proliferation als einem entscheidenden Faktor

der malignen Transformation (Rabes 1979, siehe auch Teil I., 1.2). Durch kontinuierliche Carcinogen-Applikation induzierte, enzymdefiziente praeneoplastische Zellen besitzen offensichtlich einen proliferativen Vorteil gegenüber normalen Leberzellen (Rabes et al. 1972). Die Gesamtzellzykluszeit sinkt, der mittlere Markierungsindex steigt mit zunehmender Größe des Enzymdefektbezirks an (Rabes u. Szymkowiak 1979). Der proliferative Vorteil von möglicherweise praeneoplastischen Subpopulationen konnte in einer erhöhten Resistenz dieser Zellen gegenüber der toxischen Aktivität eines Carcinogens liegen (Farber 1976, Rabes 1979), da in enzymdefizienten Herden die proliferative Antwort nach Carcinogenexposition nicht in der Weise gehemmt wird (Rabes 1979), wie es für normale Hepatozyten beschrieben ist (Craddock 1976, Rabes et al. 1970). Der Grund hierfür könnte in einem selektiven Wachstumsdruck auf die praeneoplastischen Bezirke liegen (Rabes 1979), da sie im Gegensatz zum normalen Lebergewebe, das aufgrund der toxischen Wirkung des Carcinogens einem kontinuierlichen Zellverlust ausgesetzt ist, offensichtlich ungehemmt proliferieren können. Die Zellen in Enzymdefektbezirken scheinen sich darüber hinaus homöostatischen Regulationsmechanismen zu entziehen, sie werden refraktär gegen den Proliferationsstimulus einer partiellen Hepatektomie (Rabes et al. 1970).

Ähnlich eingehende Untersuchungen liegen für die Initialstadien der Nierencarcinogenese nicht vor. Untersuchungen über die praeneoplastischen Veränderungen an der Rattenniere werden durch die hohe Heterogenität der Zellpopulationen des Organs erschwert. In licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich Frühstadien mesenchymaler Tumoren 12 bis 16 Wochen nach einmaliger DMN-Applikation als kleinere Ansammlungen mesenchymaler Zellen im intertubulären Raum der Nierenrinde, vermehrt jedoch in der cortico-medullären Übergangszone nachweisen lassen (Hard 1970/b). Gusek et al. (1966) konnten in enzymhistochemischen Untersuchungen intertubuläre, proliferierende Fibroblasten und Angioblasten als Frühstadien Cycasin-in-

duzierter interstitieller Tumoren nachweisen. Diese zeigten unter anderem eine im Vergleich zu intakten Tubuli erniedrigte Aktivität für Glucose-6-Phosphatase, Succino-Dehydrogenase und 5'-Nucleotidase.

Auf der anderen Seite lassen sich epitheliale Tumoren mit hoher Wahrscheinlichkeit vom proximalen Tubulusepithel herleiten (Hard u. Butler 1971/c). Zwölf Wochen nach Carcinogen-Applikation sind proliferierende Tubuli in der Nierenrinde in enger Nachbarschaft der Glomerula die ersten praeneoplastischen Veränderungen. Diese Tubuli weisen häufig ein irreguläres Epithel auf, das in Form papillärer Strukturen in das Lumen der Tubuli einwächst. Der Prozeß der tubulären Epithelproliferation schreitet fort, so daß das Lumen des ursprünglichen Tubulus vollständig von Zellen ausgefüllt wird. Es kann aber auch zur Entwicklung von Zysten kommen, die an Größe ständig zunehmen, wobei zum Teil intracystisch papilläre Epithelproliferationen nachweisbar sind. Diese praeneoplastischen Veränderungen führen schließlich zu kleinen, adenom-ähnlichen Herden in der Nierenrinde (Magee u. Barnes 1962).

In systematischen Untersuchungen fanden Bannasch u. Schacht (1968) an Nieren von Ratten, denen sieben oder neun Wochen lang eine 12 mg %ige N-Nitrosomorpholin-Lösung im Trinkwasser angeboten wurde, stark glykogenspeichernde Nierentubuli, die 22 bis 87 Wochen nach dem Absetzen des Carcinogens nachweisbar waren und aus denen sich basophile Adenome entwickelten. Daneben traten nach 35 bis 37 Wochen eosinophile Zellen mit feinkornigem Zytoplasma auf, die sich zu oxyphilen Adenomen fortentwickelten.

Die Transformation der Speichertubuli in Tumoren konnte in allen Stufen verfolgt werden: Nach einer cystischen Erweiterung der Tubuli bildet sich ein mehrschichtiges, proliferierendes Epithel, in dem es zu Zellatypien kommt. Mit fortschreitender Tumorgroße nimmt der Anteil der glykogenhaltigen Zellen mehr und

mehr ab (Bannasch u. Schacht 1970). Somit sind N-Nitrosomorpholin-induzierte Glykogen-speichernde Zellen nicht als endgültige Tumorzellen, sondern als Vorläufer oder praeneoplastische Zellpopulationen von azidophilen und basophilen Adenomen anzusehen.

Im Gegensatz dazu konnten bei der vorliegenden Untersuchung zwölf Monate nach Carcinogen-Applikation durch die PAS-Reaktion oder mit Best'schem Carmin keine Glykogen-Speicherzellen nachgewiesen werden. Möglicherweise war zu diesem Zeitpunkt die Transformation zu Glykogen-armen bzw. -freien Zellen bereits vollzogen, was durch die Beobachtung unterstützt wird, daß sämtliche beobachteten praeneoplastischen Herde basophil waren.

Die erhöhte proliferative Aktivität dieser basophilen Herde war autoradiographisch nachweisbar. Der Markierungsindex lag in hyperplastischen Tubuli in der Regel deutlich über dem des umgebenden Parenchyms.

Trotz dieser Vielfalt an enzymhistochemischen, morphologischen und autoradiographischen Untersuchungen bleibt die Frage offen, welche Charakteristika eine Zelle in der frühen Phase der praeneoplastischen Periode besitzt.

Nicht alle enzymdefizienten Herde in der Rattenleber sind im strengen Sinn als praeneoplastisch anzusehen, da sich aus der Vielzahl von Enzymdefektbezirken während der Überlebenszeit der Tiere nur wenige Carcinome entwickeln (Rabes et al. 1972). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, daß praeneoplastische Foci aus einer einzigen initiierten Zelle klonal entstehen (Rabes et al. 1982/a). Diese anfangs homogene Zellpopulation entwickelt sich im Lauf der Zeit zu einer heterogenen Population, die sich phänotypisch (Bannasch 1976) und in ihrem Proliferationsverhalten (Rabes et al. 1972) unterscheidet.

Wo der entscheidende Schritt beim Übergang von der Praeneoplasie in das maligne Wachstum liegt, ist ungeklärt. Ähnlich wie bei der Initialphase proliferative Vorgänge Bedeutung haben, ist anzunehmen, daß in der Latenz- bzw. Promotionsphase die Proliferation für die Realisation des malignen Phänotyps eine wichtige Rolle spielt. Hierfür gibt es bei den klassischen Promotionsmodellen Haut- und Leber-Cancerogenese klare Hinweise, und dies dürfte auch für die Nierencarcinogenese zutreffen.

ZUSAMMENFASSUNG

=====

Dimethylnitrosamin (DMN) induziert bei einmaliger Applikation in hohen Dosen selektiv Nierentumoren. In Anlehnung an das Modell der regenerierenden Rattenleber wurde durch eine unilaterale Nephrektomie eine Proliferationswelle in der verbleibenden Niere induziert, um die Interaktion von DMN mit ruhenden und proliferierenden Zellen der Niere biochemisch zu bestimmen. Gleichzeitig wurde versucht, die Entstehung von Nierentumoren mit dem Applikationszeitpunkt des Carcinogens im Zellzyklus zu korrelieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob zellzyklusspezifische Unterschiede im Alkylierungsmuster der DNA-Basen für die Dosen 2, 10, 20 bzw. 30 mg/kg DMN bestehen. Gruppen von männlichen Ratten (Wistar AF/Han) erhielten ^{14}C -markiertes DMN in der G_1 -Phase (4 Std. nach unilateraler Nephrektomie) oder zum Zeitpunkt maximaler DNA-Synthese (37,5 Std. p.Op.) als Einzeldosis intraperitoneal injiziert. 8 Std. nach der Injektion wurde die DNA der Nieren isoliert, das DNA-Basen-Hydrolysat säulenchromatographisch getrennt und die molaren Fraktionen von Purin-Basen und ihren Alkylierungsprodukten 3-Methyl-Adenin, 7-Methyl-Guanin und O^6 -Methyl-Guanin bestimmt.

7-Methyl-Guanin entsteht nahezu linear zur Dosis. Für hohe Dosen ist die Methylierung in der S-Phase geringer als in G_1 . Die molare Fraktion des potentiell promutagenen O^6 meGua liegt etwa um den Faktor 10 niedriger als für 7 meGua. Unterschiede zwischen DMN-Exposition in der G_1 - und S-Phase ergeben sich aus dem O^6 meGua / 7 meGua Quotienten. Nach 2 mg/kg DMN sind aufgrund der geringen molaren Mengen von O^6 meGua keine eindeutigen Aussagen möglich. Der O^6 meGua / 7 meGua Quotient ist nach Exposition mit 10 mg/kg DMN in der

S-Phase signifikant niedriger als in G_1 . Dies ist ein Hinweis für eine erhöhte Reparaturkapazität der regenerierenden Rattenniere für das promutagene Alkylierungsprodukt. Nach 20 und 30 mg/kg DMN liegt der O^6 meGua / 7 meGua Quotient nach G_1 - und S-Phase Exposition in der gleichen Größenordnung. Die Reparaturkapazität der Zellen ist bei diesen Dosen offensichtlich unabhängig vom Zellzyklus erschöpft.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob für verschiedene Dosen von DMN zellzyklusspezifische Unterschiede bei der Tumorentwicklung während zwei Jahren bestehen. Einem Teil der Tiere wurde vor der Tötung Tritium-markiertes Thymidin intraperitoneal injiziert, um die proliferative Aktivität der induzierten Tumoren autoradiographisch bestimmen zu können.

Analog zu den biochemischen Untersuchungen erhielten Gruppen von männlichen Ratten (Wistar AF/Han) eine einmalige Dosis von 10, 20 oder 30 mg/kg DMN entweder in der G_1 -Phase oder in der S-Phase nach unilateraler Nephrektomie intraperitoneal injiziert. Eine Kontrollgruppe wurde lediglich unilateral nephrektomiert.

Gewichtsbestimmungen nach DMN-Applikation ergaben, daß die Kontrolltiere ihr Ausgangsgewicht nach einem leichten Gewichtsabfall zwischen dem dritten und vierten Tag nach unilateraler Nephrektomie wieder erreichten. Starker Gewichtsverlust trat nach DMN ein. Nach Applikation in der S-Phase ist der Gewichtsverlust deutlich höher und verlängert als nach DMN-Injektion in der G_1 -Phase.

Die Mortalität infolge akut toxischer Wirkung von DMN ist nach Applikation in der G_1 -Phase deutlich niedriger als nach Exposition in der S-Phase. Dies ist möglicherweise auf einen verminderten Metabolismus des Carcinogens in der Frühphase nach der Operation zurückzuführen.

Nach 10 mg/kg entstehen Tumoren weder nach Exposition in G_1 -, noch in der S-Phase.

Für die Dosen 20 und 30 mg/kg DMN ergeben sich keine eindeutigen Unterschiede in bezug auf die Tumorzinzidenz für die G_1 - und S-Phase. Dies stimmt mit Befunden aus der biochemischen Untersuchung überein, wonach bei diesen Dosen die Reparaturkapazität der Zellen für das promutagene O^6 meGua unabhängig vom Zellzyklus erschöpft ist.

Zwischen dem Differenzierungsgrad der induzierten Tumoren und dem Injektionszeitpunkt besteht keine Korrelation. Generell überwiegen die epithelialen deutlich gegenüber den mesenchymalen Nierentumoren.

Praeneoplastische, proliferierende Tubuli weisen in der Regel eine deutlich höhere Proliferation auf als das umgebende Parenchym.

Für Untersuchungen über die Bedeutung der Zellproliferation für die maligne Transformation am Modell der regenerierenden Ratteniere ist die starke Heterogenität der Zellzykluskompartimente ein kritischer, limitierender Faktor. Im Gegensatz zur regenerierenden Rattenleber läßt sich an der Niere eine Zellzyklussynchronisation nicht erreichen. Daher ist eine eindeutige Zuordnung initiierender Effekte alkylierender chemischer Carcinogene an Zellen, die sich in der G_1 - oder S-Phase befinden, nur möglich, wenn man potentiell promutagene Alkylierungsprodukte selektiv in spezifischen Target-Zellpopulationen der Niere bestimmen kann.

LITERATURVERZEICHNIS

=====

- ABBOTT, P.J., and SAFFHILL, R.: DNA synthesis with methylated poly dC-dG-templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O⁶-methylguanine.
Biochim. Biophys. Acta 562: 51-61, 1979.
- BANNASCH, P.: The cytoplasm of hepatocytes during carcinogenesis.
In: Rec. Res. Cancer Res., Vol. 13, Springer Berlin, Heidelberg, New York 1968.
- BANNASCH, P. und SCHACHT, U.: Nitrosamin-induzierte tubuläre Glykogenspeicherung und Geschwulstbildung in der Rattenniere.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 1: 95-97, 1968.
- BANNASCH, P. und SCHACHT, U.: Morphogenese und Mikromorphologie experimenteller Nierentumoren vom Typ des sogenannten Hypernephroms.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 54: 464-470, 1970.
- BANNASCH, P.: Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic modules.
Cancer Res. 36: 2555-2562, 1976.
- BERENBLUM, I.: Sequential aspects of chemical carcinogenesis: Skin.
In: F.F. Becker (ed.): Cancer: A Comprehensive Treatise. Vol. I, p. 323-344. Plenum Press, New York, 1975
- BOGDEN, J.M., EASTMANN, A., and BRESNICK, E.: A system in mouse liver for the repair of O⁶-methylguanine lesions in methylated DNA.
Nucleic Acids Res. 9: 3089-3103, 1981.
- BRENT, T.P.: Partial purification and characterization of a human 3-methyladenine-DNA glycosylase.
Biochemistry 18: 911-912, 1979.
- CATHCART, R., and GOLDTHWAIT, D.A.: Enzymatic excision of 3-methyladenine and 7-methylguanine by a rat liver nuclear fraction.
Biochemistry 20: 273-280, 1981.
- CAYAMA, E., ISUDA, H., SARMA, D.S.R., and FARBER, E.: Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation.
Nature 275: 60-62, 1978.

- O'CONNOR, P.J., CAPP, M.J., CRAIG, A.W.: Comparative studies of the hepatocarcinogen N,N-dimethylnitrosamine in vivo: Reactive sites in rat liver DNA and the significance of their relative stabilities.
Br. J. Cancer 27: 153-166, 1973.
- O'CONNOR, P.J., MARGISON, G.P., CRAIG, A.W.: Phosphotriesters in rat liver DNA after the administration of the carcinogen N,N-dimethylnitrosamine in vivo.
Biochem J. 145: 475-482, 1975.
- CRADDOCK, V.M., and MAGEE, P.N.: Reaction of the carcinogen dimethylnitrosamine with nucleic acids in vivo.
Biochem. J. 89: 32-37, 1963.
- CRADDOCK, V.M.: Reaction of the carcinogen dimethylnitrosamine with proteins and with thiol compounds in the intact animal.
Biochem. J. 94: 323-330, 1965.
- CRADDOCK, V.M.: Liver carcinomas induced in rats by a single administration of dimethylnitrosamine after partial hepatectomy.
J. Natl. Cancer Inst. 47: 889-907, 1971.
- CRADDOCK, V.M.: The pattern of methylated purines in DNA of intact and regenerating liver of rats treated with the carcinogen dimethylnitrosamine.
Biochem. Biophys. Acta. 312: 202-210, 1973.
- CRADDOCK, V.M.: Cell proliferation and experimental liver cancer.
In: H. Cameron, D.A. Linsell, and G.P. Warwick (eds.), Liver Cell Cancer, 153-201, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., SCHMÄHL, D. und MÜLLER, M.: Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen.
Naturwissenschaften 48: 134-135, 1961.
- DRUCKREY, H., SCHMÄHL, D., DISCHLER, W. und SCHILDBACH, A.: Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung.
Naturwissenschaften 10: 217-228, 1962.
- DRUCKREY, H., STEINHOFF, D., PREUSSMANN, R. und IVANKOVIC, S.: Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methylnitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten.
Z. Krebsforsch. 66: 1-10, 1964.
- DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S. und SCHMÄHL, D.: Organotrope karzinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten.
Z. Krebsforsch. 69: 103-201, 1967.

- EKER, R.: Familial renal adenomas in Wistar rats.
Acta Path. Microbiol. Scand. 34: 554-562, 1954.
- EMMELOT, P., and SCHERER, E.: The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. A quantitative approach.
Biochim. Biophys. Acta 605: 247-304, 1980.
- EPSTEIN, S., ITO, N., MERKOW, L., and FARBER, E.: Cellular analysis of liver carcinogenesis. The induction of large hyperplastic nodules in the liver with 2-Fluorenylacetamide or ethionine and some aspects of their morphology and glycogen metabolism.
Cancer Res. 27: 1702-1711, 1967.
- FARBER, E., and BASERGA, R.: Differential effects of hydroxy-urea on survival of proliferating cells in vivo.
Cancer Res. 29: 136-139, 1969.
- FARBER, E., PARKER, S., and GRUENSTEIN, M.: The resistance of putative premalignant liver cell populations, hyperplastic nodules, to the acute cytotoxic effects of some hepatocarcinogens.
Cancer Res. 36: 3876-3887, 1976.
- McFARLANE, D.: Experimental nephritis in the rat.
J. Path. Bact. 52: 17, 1941.
- FRIDMANN-MANDUZIO, A., GOL-WINKLER, R., BETZ, E.H., and GOUTIER, R.: Tumour frequency and characteristics after a single dose of dimethylnitrosamine or diethylnitrosamine in partially hepatectomized rats.
Z. Krebsforsch. 90: 13-24, 1977.
- FRIEDRICH-FRESKA, H., GÖSSNER, W. und BÖRNER, P.: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin.
Z. Krebsforsch. 72: 226-239, 1969.
- GERCHMANN, L.L., and LUDLUM, O.B.: The properties of O⁶-methylguanine in templates for RNA-polymerase.
Biochim. Biophys. Acta, 308: 310-316, 1973.
- GOTH, R., and RAJEWSKY, M.F.: Molecular and cellular mechanisms associated with pulse carcinogenesis in the rat nervous system by ethylnitrosourea: ethylation of nucleic acids and elimination rates of ethylated bases from the DNA of different tissues.
Z. Krebsforsch. 82: 37-64, 1974.
- GUSEK, W., BUSS, H. und KRÜGER, C.H.: Morphologische und histochemische Befunde an experimentellen Nierentumoren der Ratte.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 50: 337-343, 1966.

- HADJIOLOV, P.: Induction of nephroblastomas in the rat with dimethylnitrosamine.
Z. Krebsforsch. 71: 59-62, 1968.
- HARD, G.C., and BUTLER, W.H.: Cellular analysis of renal neoplasia: induction of renal tumors in dietary conditioned rats by dimethylnitrosamine, with a reappraisal of morphological characteristics.
Cancer Res. 30: 2796-2805, 1970/a.
- HARD, G. C., and BUTLER, W.H.: Cellular analysis of renal neoplasia. Light microscope development of interstitial lesions induced in the rat kidney by a single, carcinogenic dose of dimethylnitrosamine.
Cancer Res. 30: 2806-2815, 1970/b.
- HARD, G.C., and BUTLER, W.H.: Ultrastructural study of the development of interstitial lesions leading to mesenchymal neoplasia induced in the rat renal cortex by dimethylnitrosamine.
Cancer Res. 31: 337-347, 1971/a.
- HARD, G.C., and BUTLER, W.H.: Ultrastructural analysis of renal mesenchymal tumor induced in the rat by dimethylnitrosamine.
Cancer Res. 31: 348-365, 1971/b.
- HARD, G.C., and BUTLER, W.H.: Ultrastructural aspects of renal adenocarcinoma induced in the rat by dimethylnitrosamine.
Cancer Res. 31: 366-372, 1971/c.
- HARD, G.C., and SHAW, D.M.: Proliferative response in the rat kidney induced by a single, carcinogenic dose of dimethylnitrosamine.
Cell Tissue Kinet. 7: 433-441, 1974.
- HARD, G.C.: Autoradiographic analysis of proliferative activity in rat kidney epithelial and mesenchymal cell subpopulations following a carcinogenic dose of dimethylnitrosamine.
Cancer Res. 35: 3762-3773, 1975.
- HARD, G.C.: Effect of age at treatment on incidence and type of renal neoplasm induced in the rat by a single dose of dimethylnitrosamine.
Cancer Res. 39: 4965-4970, 1979.
- HARTMANN, A., und RABES, H.M.: Die Entstehung praeneoplastischer Laesionen in der Rattenleber nach zweimaliger Karzinogenexposition in spezifischen Phasen des Zellzyklus.
Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 66: 503, 1982.
- HEATH, D.F., and DUTTON, A.: The detection of metabolic products from dimethylnitrosamine in rats and mice.
Biochem. J. 70: 619-626, 1958.

- HEATH, D.F.: The decomposition and toxicity of dialkylnitrosamine in rats.
Biochem. J. 85: 72-91, 1962.
- HEINE, W.-D., STÖCKER, E. und HEINE, H.-D.: Tageszeitliche Rhythmen der Zellproliferation in der kompensatorisch regenerierenden Niere nach unilateraler Nephrektomie.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 9: 75-96, 1971.
- HEINE, W.-D., and STÖCKER, E.: Regeneration of kidney parenchyma under normal and pathological conditions.
Beitr. Path. 145: 89-99, 1972.
- HOWARD, A., and PELC, S.R.: Synthesis of DNA in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage.
Heredity. 6, 261, suppl. Symposium on Chromosome Breakage, Edinburgh: Oliver and Boyd, 1953.
- HÜBNER, K.: Kompensatorische Hypertrophie, Wachstum und Regeneration der Rattenniere.
Ergeb. allg. Path. Anat. 48: 1-80, 1967.
- ITO, N., HIASA, Y., TAMAI, A., and YOSHIDA, K.: Effect of unilateral nephrectomy on the development of kidney tumour in rats treated with N-Nitrosodimethylamine.
Gann 60: 319-327, 1969.
- JASMIN, G., and RIOPELLE, J.L.: Renal adenomas induced by dimethylnitrosamine. Enzyme histochemistry in the rat.
Arch. Path. 85: 298-305, 1968.
- KIRBY, K.S.: A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids. Evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein.
Biochem. J. 66: 495-504, 1957.
- KITAGAWA, T.: Sequential phenotypic changes in hyperplastic areas during hepatocarcinogenesis in the rat.
Cancer Res 36: 2534-2539, 1976.
- KLEIHUES, P., and MARGISON, G.P.: Carcinogenicity of N-methyl-N-nitrosoourea. Possible role of excision repair of O⁶-methylguanine from DNA.
J. Natl. Cancer Inst. 53: 1839-1841, 1974.
- KLEIHUES, P., and MARGISON, G.P.: Exhaustion and recovery of repair excision of O⁶-methylguanine from rat liver DNA.
Nature 259: 153-155, 1976.
- KNECHT, M.: Untersuchungen über eine mikrosomale N-Demethylase in verschiedenen Organen der Ratte in vivo.
Z. Naturforsch. 216: 799, 1966.

- KNECHT, M.: Verteilung und Verweilzeit von Dimethylnitrosamin im Organismus der Ratte.
Z. Krebsforsch. 69: 293-296, 1967.
- LAWLEY, P.D.: Some chemical aspects of dose-response relationship in alkylation mutagenesis.
Mutat. Res. 23: 283-295, 1974.
- LAWLEY, P.D., and MARTIN, C.N.: Molecular mechanism in alkylation mutagenesis. Induced reversion of bacteriophage T4rIIAP72 by ethylmethanesulphonate in relation to the extent and mode of ethylation of purines in bacteriophage deoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 145: 85-91, 1975.
- MCLEAN, A.E.M., and MAGEE, P.N.: Increased renal carcinogenesis by dimethylnitrosamine in protein deficient rats.
Brit. J. exp. Path. 51: 587, 1970.
- LIJINSKY, W., LOO, J., and ROSS, A.E.: Mechanism of alkylation of nucleic acids by nitrosodimethylamine.
Nature (London) 218: 1174, 1968.
- LINDAHL, T.: DNA-repair enzymes.
Annu. Rev. Biochem. 51: 61-87, 1982.
- LOVELESS, A.: Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides.
Nature 223: 206-207, 1969.
- MAGEE, P.N.: Toxic liver injury. The metabolism of dimethylnitrosamine.
Biochem. J. 64: 676-682, 1956.
- MAGEE, P.N., and BARNES, J.M.: The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine.
Brit. J. Cancer 10: 114, 1956.
- MAGEE, P.N., and BARNES, J.M.: Induction of kidney tumours in the rat with Dimethylnitrosamine (N-Nitrosodimethylamine).
J. Path. Bact. 84: 19-31, 1962.
- MAGEE, P.N., and BARNES, J.M.: Carcinogenic nitroso compounds.
Advanc. Cancer Res. 10: 163-246, 1967.
- MAGEE, P.N.: Activation and inactivation of chemical carcinogens and mutagens in the mammal.
In: P.N. Campbell, and F. Dickens (eds.), Essays in Biochemistry, Vol. 10, p. 105-136. Academic Press, London, 1974.

- MAGEE, P.N., PEGG, A.A., and SWANN, P.F.: Molecular mechanism of chemical carcinogenesis.
In: Handb. Allg. Path., Bd. 6, Geschwülste II/6: 329-419.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975.
- MARGISON, G.P., and O'CONNOR, P.J.: Biological implications of the instability of the N-glycosidic bond of 3-methyl deoxy-adenosine in DNA.
Biochim. Biophys. Acta. 331: 349-356, 1973.
- MARGISON, G.P., and PEGG, A.E.: Enzymatic release of 7-methyl-guanine from methylated DNA by rodent liver extracts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 861-865, 1981.
- MEHTA, J.R., LUDLUM, D.B., RENARD, A., and VERLY, W.G.: Repair of O⁶ ethylguanine in DNA by a chromatin fraction from rat liver: transfer of the ethyl group to an acceptor protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 6766-6770, 1981.
- MEISTER, P. und RABES, H.M.: Nierentumoren durch Diäthyl-nitrosamin nach partieller Leberresektion. Morphologie und Wachstumsverhalten.
Z. Krebsforsch. 80: 165-168, 1973.
- MOHR, U. und HILFRICH, J.: Effect of a single dose of N-diethylnitrosamine on the rat kidney.
J. Natl. Cancer Inst. 49: 1729-1731, 1972.
- MONTESANO, R., MOHR, U., MAGEE, P.N., HILFRICH, J., and HAAS, H.: Additive effect in the induction of kidney tumours in rats treated with dimethylnitrosamine and etylmethanesulphonate.
Br. J. Cancer 29: 50-58, 1974.
- MONTESANO, R., BRÉSIL, H., and MARGISON, G.P.: Increased excision of O⁶-methylguanine from rat liver DNA after chronic administration of dimethylnitrosamine.
Cancer Res. 39: 1798-1802, 1979.
- MÜLLER, L., and Rabes, H.M.: Cell cycle dependent initiation of ATP-ase-deficient preneoplastic cell populations in regenerating rat liver.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 105: A22, 1983.
- MURPHY, G.P., MIRAND, E.A., JOHNSTON, G.S., SCHMIDT, J.D., and SCOTT, W.W.: Renal tumours induced by a single dose of dimethylnitrosamine: morphologic, functional, enzymatic, and hormonal characterizations.
Invest. Urol. 4: 39-56, 1966.

- MYRNES, B., NORSTRAND, U., GIERCKSKY, K.⁶E., SJUNNESKOG, C., and KROKAN, H.: A simplified assay for O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase activity and its application to human neoplastic and non-neoplastic tissues. *Carcinogenesis* 5: 1061-1064, 1984.
- NICOLL, J.W., SWANN, P.F., and PEGG, A.E.: Effect of dimethylnitrosamine on persistence of methylated guanines in rat liver and kidney DNA. *Nature* 254: 261-262, 1975.
- NOLTENIUS, H., ASCHENBACH, H., OEHLERT, W., und SCHELLHAS, H.: Experimentelle Nierenvergrößerung nach unilateraler Nephrektomie bei Ratten. *Beitr. path. Anat.* 132: 220-241, 1965.
- OLLSON, M., and LINDAHL, T.: Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O⁶-methylguanine to a protein cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 255: 10569-10571, 1980.
- PEGG, A.E.: Formation and metabolism of alkylated nucleosides: Possible role in carcinogenesis by nitroso compounds and alkylating agents. In: *Advances in Cancer Research*. G. Klein, and S. Weinhouse (eds.), Vol. 25, Academic Press, New York, San Francisco, London, p. 195-269, 1977/a.
- PEGG, A.E.: Alkylation of rat liver DNA by dimethylnitrosamine: Effect of dosage on O⁶-methylguanine levels. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 681-687, 1977/b.
- PEGG, A.W., and HUI, G.: Formation and subsequent removal of O⁶-methylguanine from deoxyribonucleic acid in rat liver and kidney after small doses of dimethylnitrosamine. *Biochem. J.* 173: 739-748, 1978.
- PEGG, A.E., PERRY, W., and BENETT, R.A.: Effect of partial hepatectomy on removal of O⁶-methylguanine from alkylated DNA by rat liver extracts. *Biochem. J.* 197: 195-201, 1981.
- PEGG, A.E., WIEST, L., FOOTE, R.S., MITRA, S., and PERRY, W.: Purification and properties of O⁶-methylguanine-DNA transmethylase from rat liver. *J. Biol. Chemistry.* 258: 2327-2333, 1983.
- PEGG, A.E., and WIEST, L.: Regulation of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase levels in rat liver and kidney. *Cancer Res.* 43: 972-975, 1983.
- PHILLIPS, Th.L., and LEONG, G.F.: Kidney cell proliferation after unilateral nephrectomy as related to age. *Cancer Res.* 27: 286-292, 1967.

- PITOT, C.H., and SIRICA, A.E.: The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 605: 191-215, 1980.
- RABES, H.M., and BRÄNDLE, H.: Synthesis of RNA, Protein and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy.
Cancer Res. 29: 817-822, 1969.
- RABES, H., HARTENSTEIN, R., and SCHOLZE, P.: Specific stages of cellular response to homeostatic control during diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis.
Experientia 26: 1356-1359, 1970.
- RABES, H.M., und TUCZEK, H.-U.: Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 6: 302-312, 1970.
- RABES, H.M., HARTENSTEIN, R., und GMINDER, J.: Nierentumoren durch Diäthylnitrosamin bei partiell hepatektomierten Ratten.
Naturwiss. 58: 102-103, 1971.
- RABES, H.M., SCHOLZE, P., and JANTSCH, B.: Growth kinetics of diethylnitrosamin-induced enzyme-deficient "preneoplastic" liver cell populations in vivo and in vitro.
Cancer Res. 32: 2577-2586, 1972.
- RABES, H.M., ISELER, G., und TUCZEK, H.W.: Induzierte Synchronie von Zellzyklusphasen in der regenerierenden Rattenleber.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 59: 459, 1975.
- RABES, H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver.
In: H. Popper and F. Schaffner (eds.), Progress in Liver Diseases. Vol. 5, pp. 83-99. Grune and Stratton, New York, San Francisco, London, 1976.
- RABES, H.M., ISELER, G., CZICHOS, S., and TUCZEK, H.W.: Synchronisation of hepatocellular DNA synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of hydroxyurea.
Cancer Res. 37: 1105-1111, 1977.
- RABES, H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver.
In: Hepatotrophic factors. Elsevier-Excerpta, Medica North Holland, Amsterdam, Oxford, New York Foundation Symposium, Vol. 55: 31-59, 1978.

- RABES, H.M.: Proliferative Vorgänge während der Frühstadien der malignen Transformation.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 63: 18-39, 1979.
- RABES, H.M., CARL, P., MEISTER, P., and RATTENHUBER, U.:
Analysis of proliferative compartments in human tumors. I.
Renal Adenocarcinoma.
Cancer 44: 799-813, 1979/a.
- RABES, H.M., KERLER, R., WILHELM, R., RODE, G., RIESS, H.:
Alkylation of DNA and RNA by ^{14}C -dimethylnitrosamine in
hydroxyurea-synchronized regenerating liver.
Cancer Res. 39: 4228-4236, 1979/b.
- RABES, H.M., and SZYMKOWIAK, W.: Cell kinetics of hepatocytes
during the preneoplastic period of diethylnitrosamine-
induced liver carcinogenesis.
Cancer Res. 39: 1298-1304, 1979.
- RABES, H.M., BÜCHER, Th., HARTMANN, A., LINKE, J., and
DÜNNWALD, M.: Clonal growth of carcinogen-induced
enzyme-deficient preneoplastic cell populations in mouse
liver.
Cancer Res. 42: 3220-3227, 1982/a.
- RABES, H.M., WILHELM, R., KERLER, R., and RODE, G.: Dose- and
cell cycle-dependent O^6 -methylguanine elimination from DNA
in regenerating rat liver after (^{14}C)dimethylnitrosamine
injection.
Cancer Res. 42: 3814-3821, 1982/b.
- RABES, H.M., KERLER, R., and WILHELM, R.: DNA Alkylation and
tumor induction in regenerating rat liver after cell cycle-
related continuous N-nitroso-dimethylamine infusion.
J. Natl. Cancer Inst. 70: 193-198, 1983.
- RABES, H.M.: Die Zellkinetik in Metastasen.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 68: (1984) in Druck
- RAJEWSKY, M.F., HÜLSER, D.F., und FABRICIUS, E.: Untersuchungen
zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der
DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen
Säugerzellsystemen.
Z. Krebsforsch. 76: 266-292, 1971.
- RAJEWSKY, M.F.: Proliferative parameters of mammalian cell
systems and their role in tumour growth and carcinogenesis.
Z. Krebsforsch. 78: 12-30, 1972.
- RIOPELLE, J.L., and JASMIN, G.: Nature, classification and
nomenclature of kidney tumours induced in the rat by
dimethylnitrosamine.
J. Natl. Cancer Inst. 42: 643-662, 1969.

- ROBINS, R., and CAIRNS, J.: Quantitation of the adaptive response to alkylating agents.
Nature 280: 74-76, 1979.
- SCHERER, E., and HOFFMANN, M.: Probable clonal genesis of cellular islands induced in rat liver by diethylnitrosamine.
Eur. J. Cancer 7: 369-371, 1971.
- SCHERER, E., HOFFMANN, M., EMMELOT, P., and FRIEDRICH-FRESKA, M.: Quantitative study of foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy.
J. Natl. Cancer Inst. 49: 93-106, 1972.
- SHACKLETON, J., WARREN, W., and ROBERTS, J.J.: The excision of N-methyl-N-nitrosourea-induced lesions from the DNA of chinese hamster cells as measured by the loss of sites sensitive to an enzyme extract that excises 3-methylpurines but not O⁶-methylguanine.
Eur. J. Biochem. 97: 425-433, 1979.
- SINGER, B.: The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis.
Progr. Nucl. Acids. Res. molec. Biol. 15: 219-284, 1975.
- SINGER, B., SPENGLER, S., and BODELL, W.J.: Tissue-dependent enzyme-mediated repair or removal of O-ethyl pyrimidines and ethyl purines in carcinogen-treated rats.
Carcinogenesis 2: 1069-1073, 1981.
- STEWART, B.W., and MAGEE, P.N.: Effect of a single dose of dimethylnitrosamine on biosynthesis of nucleic acid and protein in rat liver and kidney.
Biochem. J. 125: 942-952, 1971.
- STÖCKER, E.: Der Proliferationsmodus in Niere und Leber.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 50: 53-74, 1966.
- STUMPF, R., MARGISON, G.P., MONTESANO, R., and PEGG, A.E.: Formation and loss of alkylated purines from DNA of hamster liver after administration of dimethylnitrosamine.
Cancer Res. 39: 50-54, 1979.
- SWANN, P.N., and MAGEE, P.N.: Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethylnitrosamine, dimethylsulphate and methylmethansulfonate.
Biochem. J. 11: 39-47, 1968.
- SWANN, P.F., and McLEAN, A.E.M.: The effect of diet on the toxic and carcinogenic action of dimethylnitrosamine.
Biochem. J. 107: 14-15, 1968.

- SWANN, P.F., and McLEAN, A.E.M.: Cellular injury and carcinogenesis. The effect of a protein-free high carbohydrate diet on the metabolism of dimethylnitrosamine in the rat. *Biochem. J.* 124: 283, 1971.
- SWENBERG, J.A., BEDELL, M.A., BILLINGS, K.C., UMBENHAUER, R.R., and PEGG, A.E.: Cell specific differences in O⁶alkylguanine DNA repair activity during continuous exposure to carcinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5499-5502, 1982.
- SUZUKI, N., FRAPART, M., GRINA, D.J., MEISTRICH, M.L., and WITHERS, H.R.: Cell cycle dependency of metastatic lung colony formation. *Cancer Res.* 37: 3690-3693, 1977.
- TERRACINI, B., and MAGEE, P.N.: Renal tumours in rats following injection of dimethylnitrosamine at birth. *Nature* 202: 502-503, 1964.
- THEISS, J.C., and FISCHER, G.A.: Inhibition of intracellular pyrimidine ribonucleotide reduction by deoxycytidine, arabinosylcytosine and hydroxyurea. *Biochemical Pharmacology* 25: 73-79, 1976.
- THOMAS, C., und SCHMÄHL, D.: Zur Morphologie der Nierentumoren bei der Ratte. *Z. Krebsforsch.* 66: 125-137, 1964.
- TURBERVILLE, C., and CRADDOCK, U.M.: Methylation of nuclear proteins by dimethylnitrosamine and by methionine in the rat in vivo. *Biochem. J.* 124: 725-739, 1971.
- WIESTLER, O., KLEIHUES, D., and PEGG, A.E.: O⁶-Alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human brain and brain tumors. *Carcinogenesis* 5: 121-124, 1984.
- WILLIAMS, G.M.: Functional markers and growth behavior of preneoplastic hepatocytes. *Cancer Res.* 36: 2540-2543, 1976.
- ZAK, F.G., HOLZNER, J.H., SINGER, E.J., and POPPER, H.: Renal and Pulmonary Tumours in Rats Fed Dimethylnitrosamine. *Cancer Res.* 20: 96-99, 1960.

L E B E N S L A U F

=====

15. November 1956	geboren in Dorfen als zweites Kind des Lehrer-Ehepaares Alfred und Erika Segiet, geb. Lippert
1963 - 1967	Volksschule Matzbach, Kr. Erding
1967 - 1976	Gymnasium Erding
Juni 1976	Abitur am Gymnasium Erding
1976 - 1982	Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München
April 1982 - März 1983	Praktisches Jahr im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität auf Abteilungen der II. Medizinischen, Chirurgischen und Gynäkologischen Klinik
Mai 1983	3. Teil der Ärztlichen Prüfung
Juli 1983	Approbation als Arzt
November 1983 - März 1984	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für experimentelle Pathologie (Leiter: Prof. Dr. H. Rabes) am Pathologischen Institut der Universität München (Direktor Prof. Dr. M. Eder)
seit April 1984	wissenschaftlicher Assistent am Pathologischen Institut der Universität München (Direktor Prof. Dr. M. Eder)

